

Санкт-Петербургский государственный университет
Кафедра зоологии беспозвоночных

Зорина Наталья Александровна

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Экспрессия генов WNT-каскада в процессе
стробилиляции *Aurelia aurita* (Cnidaria: Scyphozoa).

Научный руководитель:
К.б.н. кафедры
зоологии беспозвоночных
Старунов В.В.

Санкт-Петербург
2018

Оглавление.

1. Введение.....	2
2. Обзор литературы.	
2.1. Сигнальный путь Wnt: основные компоненты, пути и механизмы.....	3
2.2. Компоненты и функции сигнального пути Wnt Deuterostomia.....	5
2.3. Компоненты и функции сигнального пути Wnt у представителей групп Ecdysozoa и Lophotrochozoa.....	7
2.4. Компоненты и функции сигнального пути Wnt у Cnidaria.....	9
3. Материалы и методы.....	13
4. Результаты.....	19
5. Обсуждение результатов.....	26
6. Выводы.....	29
7. Заключение.....	30
8. Благодарности.....	31
9. Список литературы.....	32
10. Приложение 1.....	38
11. Приложение 2.....	47
12. Приложение 3.....	48

1. Введение.

Сигнальный путь Wnt является одним из важнейших молекулярных путей, регулирующих различные процессы в ходе эмбрионального и постэмбрионального развития многоклеточных животных. Показано, что он участвует в спецификации зародышевых листков и формировании первичной оси тела (Holstein 2012). В последнее время появляется все больше данных о новых функциях каскада Wnt (Kuwabara et al. 2009). Для того чтобы проследить эволюцию сигнального пути и исследовать механизмы его регуляции проводится большое количество исследований на разных группах многоклеточных животных (Holstein 2012). Особый интерес в этой связи представляет изучение данного сигнального пути у базальных групп Metazoa, таких как Cnidaria (Schuchert 2009).

Кишечнополостные - древняя группа многоклеточных животных, являющаяся сестринской группой Bilateria (Nielsen 2011). Однако в регуляции их развития участвует ряд схожих молекулярных каскадов. В настоящее время в пределах типа Cnidaria выделяют следующие классы: Hydrozoa, Scyphozoa, Anthozoa, Cubozoa и Myxozoa. Представители данных групп отличаются широким разнообразием жизненных циклов и форм.

На данный момент имеется довольно большое количество работ, посвященных изучению сигнального пути Wnt в группах Anthozoa и Hydrozoa. При этом группа Scyphozoa остается практически неизученной в этом отношении.

Таким образом, целью данной работы стало изучение функций сигнального пути Wnt у сцифоидной медузы *Aurelia aurita* в процессе стробилиации.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Идентифицировать гены, отвечающие за реализацию сигнального пути Wnt, и осуществить их филогенетический анализ.
2. Определить пространственное распределение мРНК в процессе стробилиации с помощью РНК гибридизации *in situ*.
3. Выявить влияние активаторов и ингибиторов сигнального пути Wnt на процесс стробилиации *A. aurita*.

2. Обзор литературы.

2.1. Сигнальный путь Wnt: основные компоненты, пути и механизмы.

Сигнальный путь Wnt - один из важнейших высококонсервативных молекулярных путей многоклеточных животных, который регулирует различные процессы в ходе эмбрионального и постэмбрионального развития организма.

В 1990-х гг. были обнаружены основные компоненты сигнального пути Wnt, а дальнейшие эксперименты помогли определить их функцию. Wnt - это большое семейство белков, участвующих в координации клеток в организме. Эти сигнальные молекулы изначально были идентифицированы в качестве маркеров некоторых видов раковых заболеваний (McMahon and Bradley 1990). Оказалось, что помимо этого они являются ключевыми регуляторами развития, процессов регенерации, роста, дифференцировки клеток и огромного количества других процессов, связанных с морфогенезом и определением клеточной судьбы (Albert and Othmer 2003). Сокращение Wnt произошло от слияния названий двух генов - wingless (Wg) и integrated (Int). Ген wingless плодовой мушки *Drosophila melanogaster* был идентифицирован по рецессивной мутации, приводящей к подавлению развития крыльев (Sharma and Chopra 1976). В начале 1980-х годов был обнаружен гомологичный ген позвоночных животных Int, который изначально рассматривали как протоонкоген (Nusse et al. 1984). Подробные исследования этих двух генов привели к открытию целого класса сигнальных молекул, участвующих в регуляции эмбрионального и постэмбрионального развития животных.

Механизмы воздействия Wnt на клетку принято подразделять на канонический (β -катенин-зависимый) путь и неканонические (β -катенин-независимые) пути (Huelsenken and Behrens 2002).

Канонический путь связан с накоплением и стабилизацией β -катенина в клетке (Kikuchi 2000). Катенины - семейство внутриклеточных белков, которые участвуют в клеточной адгезии и обеспечивают связь с актиновым цитоскелетом. Они контролируют состояние внеклеточного связывающего домена белков кадгеринов. β -катенин принимает участие в опухолевой трансформации при различных вариантах неоплазий у млекопитающих (Cooper et al. 2000). Также этот белок взаимодействует со многими факторами и лигандами, например, с факторами транскрипции, α -катенином, кадгерином, аксином, малыми ГТФазами. Все это указывает на его внутриклеточную многофункциональность. Кроме того, β -катенин принимает участие в механизмах адгезии,

регуляции метаболизма РНК, формировании контактов с цитоскелетом и в каноническом Wnt-сигнальном пути (Isaeva et al. 2015).

В отсутствие Wnt сигнала β -катенин в клетке взаимодействует с цитоплазматическим "деструктурирующим комплексом", состоящим из 4 компонентов (Clevers 2006):

- 1) белок-супрессор опухолей - adenomatous polyposis coli (APC),
- 2) цитоплазматический "поддерживающий" белок аксин,
- 3) протеинкиназа GSK-3 β ,
- 4) казеинкиназа (CK).

Центральным регулирующим шагом канонического Wnt-сигнального пути является фосфорилирование β -катенина компонентами комплекса деструкции. В отсутствие Wnt лигандов β -катенин фосфорилируется казеинкиназой (CKI) по 45 остатку серина (Ser45). Это, в свою очередь, запускает протеинкиназу GSK3 β , которая фосфорилирует 41(Tre 41), 37(Ser 37) и 33(Ser 33) серин/треониновые остатки (Kimelman and Xu 2006). Фосфорилирование β -катенина происходит в белковом комплексе, содержащем аксин, который может образовывать гомодимер или гетеродимер с белком-супрессором опухолей (APC), который связывает CK1(Huelsken and Behrens 2002). Два последних фосфорилированных остатка (Ser 37 и Ser 33) распознаются β -TrCP-содержащей убиквитинлигазой, которая добавляет к Lys19 и Lys49 убиквитины и таким образом запускает деструкцию β -катенина в протеасомах(Kikuchi, Kishida, and Yamamoto 2006; Liu et al. 2002). Благодаря этому в отсутствие Wnt-стимуляции цитоплазматическая концентрация β -катенина поддерживается на низком уровне.

В случае, когда белок Wnt связывается с мембранным рецептором Frizzled (Fzd), образуется рецепторный комплекс между Fzd-рецепторами и LRP6 (Low density lipoprotein Receptor-related Protein-6). Далее с этим комплексом связывается белок Dishevelled (Dvl), который восстанавливает аксин и тем самым ингибирует "деструктурирующий комплекс". Таким образом прекращается фосфорилирование β -катенина и происходит его стабилизация и накопление в клетке (Hur and Jeong 2013). Накопленный белок мигрирует в ядро и вступает во взаимодействие с ДНК-связывающими белками семейства Tcf/Lef. Вместе они включают транскрипцию генов канонического Wnt-ответа, таких как: аксин-2, виментин, Snail и другие (Graham et al. 2000). Комплекс β -катенин/Tcf/Lef

взаимодействует с различными ядерными факторами, контролирующими специфические транскрипционные мишени (Mosimann, Hausmann, and Basler 2009; Xu and Kimelman 2007).

Среди неканонических или β -катенин-независимых путей Wnt выделяют путь, который регулирует полярность клетки (PCP) и путь, регулирующий метаболизм кальция. Реализация PCP-сигнала осуществляется через небольшие G-белки - RhoA и Rac и для активации целевых генов обычно используется транскрипционный комплекс AP-1 (Veeman et al. 2003). Этот сигнальный путь не связан со спецификацией тканей, но вместо этого регулирует полярность клеток, стимулируя реорганизацию цитоскелета (Green, Nusse, and van Amerongen 2014). Путь, регулирующий метаболизм кальция функционирует через другой набор белков, которые модулируют внутриклеточную концентрацию свободного кальция и циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) (Kohn and Moon 2005).

Многие основные компоненты канонического сигнального пути Wnt являются высококонсервативным. Они были охарактеризованы от кишечнотелостных до позвоночных животных, что указывает на их важную и скорее всего аналогичную роль (Cadigan and Nusse 1997; Croce et al. 2006; Klein and Mlodzik 2005).

2.2. Компоненты и функции сигнального пути Wnt у Deuterostomia.

Изучение базальных групп вторичноротых животных может предоставить много важной информации о эволюции сигнального пути Wnt. Так, биоинформатический анализ показал, что в геноме морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* присутствует ортолог гена Wnt-A, который ранее не был обнаружен у вторичноротых животных. Возможно, подсемейство Wnt-A имелось у общего предка Deuterostomia и было потеряно позвоночными животными в ходе эволюции (Croce and McClay 2008; Erica et al. 2006). Также геномный анализ позволил идентифицировать подавляющее большинство генов, участвующих в трансдукции канонического и неканонических ответов Wnt. Поскольку только один ортолог был обнаружен в каждом представленном подсемействе, вполне вероятно, что у общего предка вторичноротых был только один ген Wnt на подсемейство (Croce et al. 2006).

Каждый из представленных Wnt-генов экспрессируется на определенной стадии эмбрионального развития *Strongylocentrotus purpuratus*. Было показано, что Wnt-8

требуется для спецификации энтодермы, а β -катенин контролирует формирование анимально-вегетативной оси и активно экспрессируется на вегетативном полюсе эмбриона морского ежа (Wikramanayake et al. 2004). Эктодерма образуется из анимального полюса животного, а энтодерма и мезодерма - из вегетативного. Повышенная экспрессия β -катенина приводит к развитию эмбрионов с эктопической энтодермой, в то время как ингибирование передачи Wnt сигналов предотвращает образование энтодермы (Wei et al. 2009).

У морской звезды *Asterina pectinifera* на стадии 16 клеток β -катенин начинает накапливаться в некоторых ядрах на вегетативном полюсе и постепенно его экспрессия усиливается. Когда эмбрион развивается до ранней гаструлы, клетки с ядерным β -катенином концентрируются в небольшой зоне на конце архентерона, и на более поздних стадиях сигнал постепенно исчезает (Miyawaki et al. 2003). Локализация и временное изменение экспрессии β -катенина свидетельствуют о том, что Wnt-каскад играет ключевую роль в формировании архентерона в процессе эмбрионального развития морских звезд.

У асцидий и ланцетников зона экспрессии β -катенина локализуется в области бластопора, который, определяет будущий задний конец эмбриона (Satou, Imai, and Satoh 2001).

Большое количество работ, связанных с изучением сигнального пути Wnt, было проведено на позвоночных животных. Локализация областей экспрессии Wnt и β -катенина явно указывают на участие данного сигнального пути в формировании первичной оси тела животных. Wnt-каскад также задействован в процессах формирования нервной, мышечной, кровеносной и мочеполовой систем (Agathon, Thisse, and Thisse 2003; Glasco et al. 2012; Heikkilä, Peltoketo, and Vainio 2001; Schneider and Mercola 2001).

Эти данные свидетельствуют о важной роли сигнального пути Wnt в формировании первичной оси тела и энтодермы, а также других важных процессах во время и после эмбрионального развития.

2.3. Компоненты и функции сигнального пути Wnt у представителей групп Ecdysozoa и Lophotrochozoa.

Большое количество исследований, посвященных изучению сигнального пути Wnt, было проведено на модельных объектах. Яркими примерами являются представители группы Ecdysozoa: нематода *Caenorhabditis elegans* и плодовая мушка *Drosophila melanogaster*.

В процессе эмбрионального развития *C. elegans* на стадии 4 клеток очень важным является взаимодействие между бластомерами P2 и EMS (Zhang, Skop, and White 2008). При нормальном развитии EMS разделяется на 2 бластомера: MS, который дает начало мезодермальным производным, и E, который отвечает за формирование энтодермы. Было установлено, что способность EMS производить клеточные линии с разными судьбами напрямую зависит от его взаимодействия с бластомером P2. Если P2 по каким-либо причинам не может передать сигнал EMS, то ни один из потомков EMS не способен дать начало энтодерме. Таким образом, P2 индуцирует образование энтодермы, и в отсутствие взаимодействия P2-EMS все клетки будут иметь MS-подобную судьбу (Thorpe et al. 1997). Передача сигналов P2-EMS может стимулировать судьбу E путем уменьшения количества или активности белка POP-1 в E-бластомере (Lin, Hill, and Priess 1998). POP-1 представляет собой белок HMG-домена, сходный с белками Tcf / Lef и белком Pangolin / dTCF (Lin, Thompson, and Priess 1995). Генетические и биохимические исследования показали, что POP-1 может выполнять те же функции, что и компоненты сигнального пути Wnt TCF / LEF (Lo et al. 2004). Также было установлено, что белок POP-1 участвует в формировании осей гонад, контролируя деление клеток-предшественниц - Z1 и Z4 (Whangbo, Harris, and Kenyon 2000). Мутанты по генам семейства *tom* имеют аномально большое количество мезодермальных производных. Оказалось, что гены из этого семейства кодируют белки, подобные одному из известных компонентов Wnt-каскада: MOM-2 гомологичен сигнальным белкам Wnt, MOM-1 - поркупину (PORC), участвующему в секреции Wnt белков, а MOM-5 практически идентичен белкам Frizzled (Thorpe et al. 1997). Также были найдены гены, кодирующие белки аналогичные β -катенину и APC (Grodén et al. 1991). Эти данные убедительно свидетельствуют о важной роли сигнального пути Wnt в эмбриональном развитии нематоды *C. elegans*.

В ходе изучения формирования сегментов в процессе развития *D. melanogaster* был идентифицирован ген *wingless*, являющийся одним из участников сигнального пути Wnt (Struhl and Basler 1993). Мутации в этом гене приводят к нарушению сегментации и

паттернов генной экспрессии в каждом парасегменте, так как поддержание этих паттернов регулируется взаимодействием между клетками, экспрессирующими *wingless* и *engrailed* (Benedyk, Mullen, and DiNardo 1994). Таким образом, сигнальный путь Wnt участвует в укреплении парасегментной периодичности и в определении судьбы клеток, тем самым обеспечивая нормальное формирование сегментов вдоль передне-задней оси тела (Aman, Nguyen, and Piotrowski 2011).

В последнее время большое количество исследований проводится на немодельных объектах. Например, скрининг транскриптома онихофоры *Euperipatoides kanangrensis* позволил обнаружить по крайней мере 11 генов Wnt семейства. Показано, что они участвуют в формировании сегментов, что доказывает важную роль сигнального пути Wnt в процессе сегментации (Hogvall 2014).

Сигнальный путь Wnt также начал активно изучаться у представителей группы Lophotrochozoa (Prud'homme et al. 2002). Исследование геномных последовательностей моллюска *Lottia gigantea* и двух аннелид: полихеты *Capitella teleta* и пиявки *Helobdella robusta* позволили идентифицировать 11, 12 и 13 генов Wnt, представляющих 11, 12 и 9 подсемейств у этих видов, соответственно. Филогенетический анализ показал, что множественные дубликации и утраты генов подсемейства Wnt происходили у пиявки *Helobdella robusta* по сравнению с *Capitella teleta*, ее ближайшим родственником. Сравнение моделей экспрессии генов *H. robusta* с их недублированными ортологами у *C. teleta* дало основания предполагать, что дублицированные гены пиявки подверглись регуляторной субфункционализации по отношению к гену с одной копией у предка Annelida (Cho et al. 2010).

У другого представителя группы Annelida - *Platynereis dumerilii* было показано участие генов Wnt-каскада в процессе сегментации. Сегменты тела *P. dumerilii* являются морфологически идентичными (гомономная сегментация). Механизмы формирования сегментов червя примитивны по сравнению механизмами гетерономной сегментации. Ген полярности сегментов *engrailed* участвует в установлении сегментарных границ и экспрессируется в виде эктодермальных полос в начале сегмента. Wnt1 также экспрессируется в виде эктодермальных полос, но зона экспрессии расположена в задней части каждого сегмента. В отличие от *engrailed*, толщина полос wnt1 возрастает пропорционально длине сегмента. Экспрессия гена Wnt1 также зафиксирована в пароподиях. Эти результаты свидетельствуют о том, что гены *engrailed* и Wnt выражены в смежных областях по обе стороны от сегментной границы и играют важную роль в

формировании и поддержании сегментов как у *P. dumerilii*, так и у *D. melanogaster* (Prud'homme et al. 2003).

2.4. Компоненты и функции сигнального пути Wnt у Cnidaria.

Cnidaria - древняя группа истинно многоклеточных животных (Eumetazoa), являющихся сестринской группой Bilateria (Nielsen 2011). Данная группа представлена более чем 10 000 видов с широким разнообразием жизненных циклов и форм. В настоящее время в пределах типа Cnidaria выделяют следующие классы: Hydrozoa, Scyphozoa, Anthozoa, Cubozoa и Muxozoa. Кишечнополостные являются базальной ветвью Metazoa и характеризуются наличием двух зародышевых листков (эктодерма и энтодерма), диффузно расположенной нервной системой, элементами радиальной симметрии и хорошо выраженной осью тела. Эти признаки делают данную группу потенциально информативной в отношении изучения эволюции сигнального пути Wnt.

Большинство работ, связанных с изучением сигнального пути Wnt, проводились на модельных объектах - *Hydra vulgaris* (Hydrozoa) и *Nematostella vectensis* (Anthozoa).

В геноме *Nematostella vectensis* было идентифицировано 14 различных Wnt генов, принадлежащих к 12 из 13 подсемейств (Kusserow et al. 2005). Большинство подсемейств Wnt, обнаруженных в *Nematostella vectensis*, также присутствуют в геноме *Hydra vulgaris* (Lee et al. 2006). Помимо Wnt-лигандов были обнаружены и другие компоненты канонического и неканонических сигнальных путей, например: ортологи β -катенина, Fzd, GSK-3 β , Tcf / Lef, Dsh, APC, аксин, JNK, CamKII (Kusserow et al. 2005; Minobe et al. 2000). Таким образом, было показано наличие трех сигнальных путей Wnt у кишечнополостных. Эти данные свидетельствуют о том, что данный сигнальный путь имелся уже у общего предка Cnidaria и Bilateria.

Эпителиальные клетки гидроидного полипа *Hydra vulgaris* непрерывно делятся, мигрируют и дифференцируются в структуры, связанные с головой или ногой в соответствующем регионе (Teragawa and Bode 1990). Таким образом, процессы, связанные с осевым паттернированием постоянно участвуют в поддержании формы взрослого тела полипа (Bode 2003). Кроме того, молекулярные механизмы, участвующие в формировании осей тела, должны быть постоянно активны, так как идет образование почек во время бесполого размножения. Головной организатор, расположенный на вершине гипостома (верхняя часть головы полипа), является источником сигнала,

ответственного за формирование оси тела у *Hydra vulgaris* (Technau et al. 2000; Mariya Broun and Bode 2002). Сигнал устанавливает морфогенетический градиент, который уменьшается сверху вниз по столбцу тела. Этот градиент, называемый градиентом позиционного значения (Wolpert 1971) или градиентом активации головы (MacWilliams 1983). Экспериментальные данные показали, что трансплантация гипостома в эктопические положения вдоль тела полипа может организовать вторичную ось тела путем формирования тканей, характерных для настоящего организатора (Technau et al. 2000; Mariya Broun and Bode 2002; M. Broun 2005). Молекулярные аспекты работы головного организатора долгое время не были хорошо изучены. Исследование сигнального пути Wnt у *Hydra vulgaris* выявило важную роль канонического сигнального пути Wnt в создании и поддержании головного организатора взрослого гироидного полипа (M. Broun 2005). Было показано, что HyWnt экспрессируются в небольшом скоплении эктодермальных и энтодермальных клеток на вершине гипостома, рядом с головным организатором. Транскрипты *Hyβ-cat* также равномерно распределены по всему полипу на низком уровне, что согласуется с дополнительной функцией этого белка - участием в клеточной адгезии. Однако, в области гипостома наблюдается наиболее сильная экспрессия *Hyβ-cat*. Сигнал *HyFzd*, равномерно выражен в клетках энтодермы по всему телу полипа за исключением щупалец. Он очень слабо выражен в эктодерме, таким образом, предполагается, что основной целью передачи сигналов Wnt является энтодерма (Lee et al. 2006).

Участие сигнального пути Wnt в осевом паттернировании *Hydra vulgaris* было продемонстрировано с помощью эксперимента с использованием активатора «alsterpaullone», который специфически блокирует протеинкиназу GSK-3β и способствует накоплению β-катенина в клетках (M. Broun 2005). Эксперименты с использованием LiCl уже показывали, что ингибирование активности GSK-3β может стимулировать образование головы (Hassel, Albert, and Hofheinz 1993). В необработанных активатором полипах концентрация β-катенина в клетках тела поддерживалась на низких уровнях, а ядерный β-катенин локализовался в области гипостома. Блокирование активности GSK-3β с помощью «alsterpaullone» увеличивало внутриклеточный уровень β-катенина и способствовало накоплению ядерного β-катенина (Broun 2005). Обработанная «alsterpaullone» гидра образовывала многочисленные эктопические щупальца вдоль всего тела.

Канонический сигнальный путь Wnt также активно задействован в процессе почкования. Сначала в той части тела полипа, где формируется почка, начинают

экспрессироваться гены *NyTcf* и *Nyb-cat*, позднее - *NyWnt3*. Далее экспрессия *NyTcf* ограничивается областью гипостома новой особи, подобно его экспрессионному домену у взрослых полипа. Экспрессия *Nyb-cat* остается на высоком уровне в апикальном конце почки до тех пор, пока новый полип не отделится. Также отмечено участие сигнальном пути PCP в процессе почкования (Hobmayer et al. 2000).

Изучение генов Wnt-каскада в процессе эмбрионального и постэмбрионального развития у кораллового полипа *Nematostella vectensis* выявило локализацию почти всех генов в области бластопора во время гастрюляции и в области рта планулы или полипа после гастрюляции (Trevino et al. 2011). Методом *in situ* гибридизации было показано, что каждое подсемейство генов Wnt экспрессируется вдоль орально-аборальной оси тела в одном из двух слоев – эктодерме (*NvWntA*, 1, 2, 4 и 7) или энтодерме (*NvWnt5*, 6 и 8) (Guder et al. 2006). Границы между зонами экспрессии перекрываются. В-катенин также локализуется вдоль орально-аборальной оси тела и концентрируется в ядрах клеток в области бластопора (Wikramanayake et al. 2003). Эти данные подтверждают ключевую роль Wnt сигнала в процессе формирования первичной оси тела и спецификации зародышевых слоев (Kusserow et al. 2005). Эксперименты с использованием «*alsterpaullone*» на эмбрионах *Nematostella vectensis* также привели к образованию эктопических щупалец (Trevino et al. 2011).

В настоящее время исследования сигнального пути Wnt не ограничиваются только *Hydra vulgaris* и *Nematostella vectensis*. Важной задачей является изучение представителей группы Cnidaria, обладающих разнообразными вариантами форм и жизненных циклов. Так, колониальный гидроидный полип *Hydractinia echinata* в отличие от *Hydra vulgaris* и *Nematostella vectensis* обладает столоном. Показано, что большинство стволовых клеток (i-клетки) *H. echinata* присутствуют в столонах и контролируются каноническим сигнальным путем Wnt (Teo et al. 2006). Было установлено, что *HeWnt2*, *HeWnt11a* и *HeWnt16* экспрессируются в столонах животных, а *HeWnt3* - в оральном полюсе полипа. *Wnt2* был ярко выражен в ранних и поздних почках и постепенно рассеивался в области столона. *HeWnt11* экспрессировался в клетках столона, напоминающих нейроны по морфологии. Наконец, *HeWnt16* был выражен в гастродермисе столона, но его максимальная экспрессия наблюдалась в ветвящихся кончиках столона (Hensel et al. 2014).

Также была изучена экспрессия Wnt-лигандов в репродуктивных органах *Hydractinia echinata* - гонофорах. Экспрессия гена *HeWnt3* был зафиксирована на оральном конце гонозооида, а также на дистальном конце гонофора (Duffy and Plickert 2010). Была зафиксирована экспрессия *HeWnt2* и *HeWnt16* в молодых развивающихся гонофорах.

Также данные по *Hydractinia echinata* подтверждают участие сигнального пути Wnt в осевом паттернировании (Plickert et al. 2006). Ингибирование активности GSK-3 β с помощью «alsterpaullone» вызывает формирование дополнительных осей у эмбрионов и образование эктопических щупалец у взрослых полипов (Müller, Teo, and Frank 2004; Plickert et al. 2006; Teo et al. 2006).

Эксперимент с использованием активатора «azakenpaullone», который является специфическим ингибитором протеинкиназы GSK3, показал, что только 3 гена Wnt *Hydractinia echinata* являются компонентами канонического сигнального пути. «Azakenpaullone» усилил экспрессию генов HeWnt2, HeWnt11a и HeWnt16, экспрессия которых наблюдается в столонах, но не повлиял на другие гены (Duffy and Plickert 2010).

Подробные исследования *H.vulgaris* и *N.vectensis* позволили выявить важную роль канонического пути Wnt в процессах формирования первичной оси тела и спецификации зародышевых слоёв. Однако большинство представителей группы Cnidaria остаются практически неизученными. В связи с этим отсутствуют данные по реализации сигнального пути у медузоидного поколения. Совсем недавно были получены транскриптомные данные с разных стадий жизненного цикла представителя класса Scyphozoa - *Aurelia aurita*. Анализ этих данных показал, что гены Wnt-каскада экспрессируются на разных стадиях сложного жизненного цикла медузы (Brekman et al. 2015).

Исследования, проведенные на гидроидных полипах *H. echinata*, *Clytia hemisphaerica* и *Ectopleura larynx* подтверждают участие Wnt каскада в формировании осей тела, но не подтверждают аналогичную роль в спецификации зародышевых слоев (Teo et al. 2006). Также было зафиксировано участие канонического Wnt пути в контроле стволовых клеток у *Hydractinia echinata* (Teo et al. 2006; Miller et al. 2007). Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что зоны экспрессии Wnt генов довольно сильно варьируют в пределах группы Cnidaria. По-видимому, экспрессия Wnt генов различается в разных группах в соответствии с выполняемыми ими функциями. В то время как компоненты и общие функции сигнального пути Wnt хорошо сохранялись в группе Metazoa, некоторые лиганды Wnt, вероятно, эволюционировали независимо в различных линиях (Hensel et al. 2014a). Однако это предположение может быть подтверждено только после тщательного анализа каждого класса в типе Cnidaria и как можно более детального анализа Bilateria.

3. Материалы и методы.

Материалом для данной работы стала лабораторная линия сцифистом *Aurelia aurita* (Cnidaria: Scyphozoa) «Роскофф», выделенная из морского аквариума французской биологической станции города Роскофф. Данная линия поддерживается в искусственной морской воде при температуре +18°C в пластиковых контейнерах площадью 30*15 см в ресурсном центре культивирования микроорганизмов СПбГУ. Кормление сцифистом осуществлялось один раз в три дня, для этих целей использовались науплиусы жаброногого рачка *Artemia salina*. Через 12-24 часов после кормления производилась смена воды в контейнерах.

Сцифоидная медуза *Aurelia aurita* имеет метагенетический жизненный цикл, представляющий собой последовательную смену бесполого (полипоидного) и полового (медузоидного) поколений. Индукция стробилиции у лабораторной линии сцифистом «Роскофф» осуществлялась с помощью 5-метокси-2-метил индола (Fuchs et al 2014). Концентрация индуктора в воде составляла 5 мкМ/мл. Индуктор добавлялся в контейнеры со сцифистами один раз, после чего через сутки производилась смена воды. Для работы нами были отобраны следующие стадии: сцифистомы, ранние стробилы, поздние стробилы и эфиры (Рис. 1).

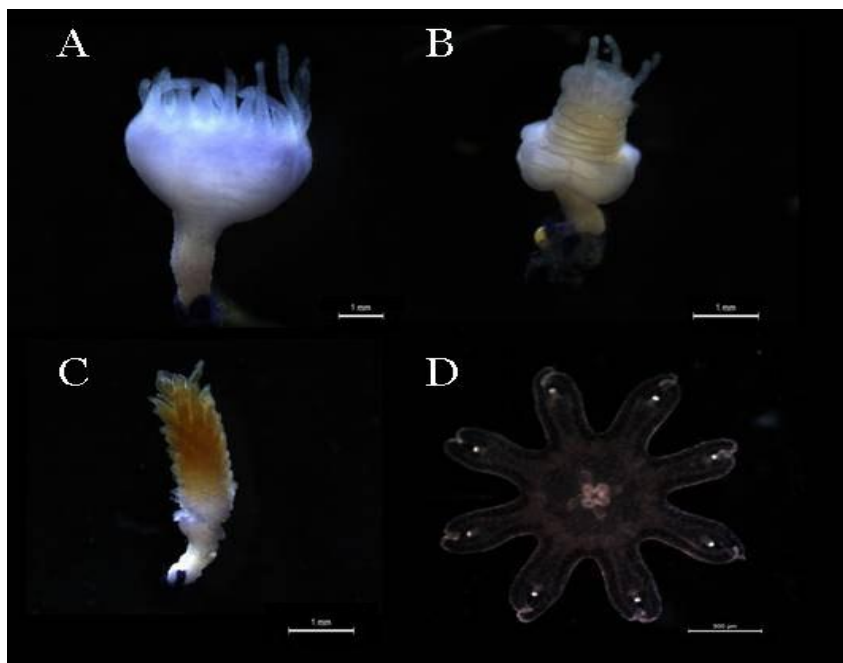


Рис. 1: Различные стадии жизненного цикла лабораторной линии *A. Aurita*.

А – сцифистома, В – ранняя стробила, С – поздняя стробила, D – эфира.

Поиск интересующих нас нуклеотидных последовательностей осуществлялся с помощью транскриптомной базы данных Compagen (<http://www.compagen.org/aurelia>). Найденные последовательности сравнивались с помощью алгоритма tblastn с генами в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), для подтверждения их принадлежности к интересующему нас семейству.

Дальнейший анализ выбранных последовательностей (определение рамки считывания, ее направления и доменного состава белка) осуществлялся с использованием биоинформатического ресурса ExPASy (<https://www.expasy.org>). Было произведено множественное выравнивание полученных последовательностей с известными генами интересующего нас семейства с помощью алгоритма Clustal Omega. Результаты выравнивания были использованы для филогенетического анализа и построения дерева, отражающего уровень гомологии между генами найденными в базах данных Compagen и NCBI. Филогенетический анализ проводился методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood), bootstrap = 500, модель эволюции - LG в программе Seaview (<http://doua.prabi.fr/software/seaview>).

На основе найденных последовательностей были изготовлены зонды для РНК гибридизации *in situ*. Для этого к выбранным генам были вручную подобраны специфические праймеры и проверены с помощью утилит PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com/PrimerQuest>) и «Олигокалькулятор» (<http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>).

Верификацию найденных последовательностей проводили с использованием специфических праймеров и двуцепочечной кДНК в качестве матрицы. Синтез кДНК проводили методом ОТ-ПЦР с матрицы тотальной РНК. Экстракция тотальной РНК из *A. aurita* осуществлялась с использованием набора для выделения РНК ZymoResearch Quick RNA (R1057T). Выделение проводили в соответствии с протоколом производителя. Синтез 1-ой цепи кДНК осуществлялся с помощью набора Mint1 (SK001) в соответствии с протоколом производителя. Синтез второй цепи кДНК осуществлялся с помощью набора Eurogen Encyclo plus PCR-kit (SK001).

Аmplification целевых фрагментов на матрице двуцепочечной кДНК проводилась с использованием Taq-полимеразы (Fermentas) и специфических праймеров. Далее осуществляли анализ полученного ПЦР-продукта методом агарозного гель-электрофореза, очистка и концентрация ДНК с помощью набора DNA Clean & Concentrator-5 (D4013). Полученные фрагменты были лигированы с использованием векторной системы pGEM®-

T Easy (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Для трансформации были использованы клеточные линии JM109 (Promega), входящие в состав набора. Химическая трансформация осуществлялась с использованием набора InsTAClone (Fermentas) в соответствии с протоколом производителя.

Дальнейший отбор клонов, в которые успешно произошло встраивание вектора, проводился стандартным методом бело-голубой селекции на среде содержащей Xgal. Отобранные таким образом клоны были использованы для выращивания суспензионных культур. Выделение плазмид осуществлялось с использованием набора ZymoResearch ZRPlazmid MiniPrep Classic (D4015) согласно протоколу производителя.

Проверка направления встраивания последовательности в плазмиды проводилась путем секвенирования с использованием оборудования Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного Парка СПбГУ. Также, осуществлялась дополнительная проверка методом аналитической ПЦР с праймерами к промоторным последовательностям для РНК полимераз T7 и SP6, а также прямого праймера к исследуемой последовательности. В зависимости от направления вставки выбиралась та или иная РНК-полимераза.

Для синтеза РНК-зондов проводились амплификация целевого фрагмента с использованием праймеров M13 и плазмиды с целевым геном в качестве матрицы. Полученные ПЦР-фрагменты очищали методом препаративного гель-электрофореза и выделяли из арозного геля с использованием набора Cleanup Mini (Евроген). В зависимости от направления вставки, синтез зондов проводился с использованием РНК-полимераз T7 либо SP6 (Fermentas/Roche) и меченых дигоксигенином нуклеотидов (Roche) согласно протоколу производителя. После синтеза раствор зонда подвергали действию ДНКазы I (Fermentas) в течение 15 минут при +37°C. Проверка качества зонда осуществлялась методом агарозного гель-электрофореза. Далее раствор зонда разводили в 50 раз водой, не содержащей нуклеаз и хранили при температуре -20°C.

Визуализация зон экспрессии целевых генов проводилась методом РНК-гибридизации *in situ*. Перед этим сцифистомы, стробилы и эфиры анестезировали в 7% растворе MgCl₂ (на дистиллированной воде) до полного расслабления мускулатуры. Фиксация животных осуществлялась в 4% растворе параформальдегида на морской воде (ПФА) при +4°C в течение 12 часов. После этого фиксатор замещали на метанол и хранили при температуре -80°C. Протокол РНК-гибридизации, адаптированный для *A. aurita* представлен в приложении 3.

Каждый эксперимент проводили с обязательной постановкой контрольных опытов. В качестве положительного контроля использовался ген RF-амида, зоны экспрессии которого хорошо известны (Рис. 2). В случае отрицательного контроля зонд в пробу не добавлялся.

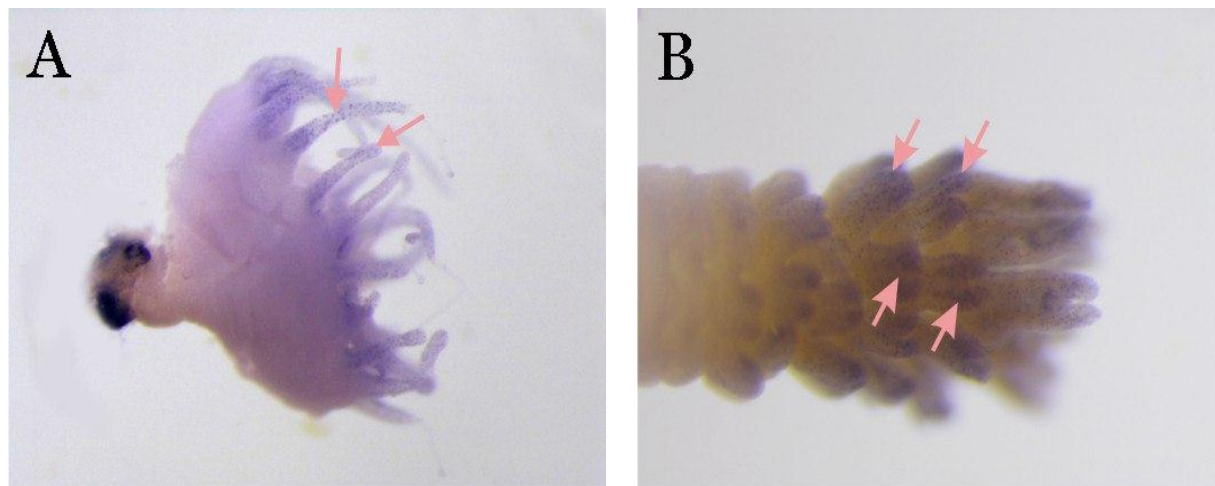


Рис. 2: Зоны экспрессии гена RF-амида.

А – сцифистома, В – поздняя стробила. Стрелками указаны зоны экспрессии.

Для выяснения роли сигнального пути Wnt в процессе стробилизации *A. aurita* нами были поставлены эксперименты с использованием активаторов и ингибиторов Wnt-каскада.

Ингибитор IWP-3 блокирует ацилтрансферазу поркупин (PORC), тем самым блокируя секрецию Wnt белков. Он также блокирует фосфорилирование рецептора LRP6 и накопление Dvl и β -катенина. Ингибитор iCRT14 является блокатором одного из главных компонентов канонического сигнального пути- β -катенина, а также модулирует связывание фактора TCF с ДНК. Активатор BIO является мощным ингибитором протеинкиназы GSK-3 α/β , которая участвует в деградации β -катенина. Активатор azakenpaullone также является ингибитором протеинкиназы GSK-3 β .

Исходная концентрация всех растворов составляла 10мМ. Ингибиторы и активаторы были растворены в 100% DMSO. Исходные растворы разбавлялись в 1000 раз морской водой до концентрации ингибитора/активатора 10мкМ и концентрации DMSO 0.1%. Из 10мкМ растворов были приготовлены растворы с концентрациями 8мкМ, 6мкМ, 4мкМ, 2мкМ и 1мкМ действующего вещества и концентрацией DMSO 0.1%. В качестве

негативного контрольного опыта использовали раствор морской воды с DMSO с той же концентрацией (Табл. 1).

мкМ	10	8	6	4	2	1	контроль
10 мкМ акт./инг.	1,5мл	1,2мл	0,9мл	0,6мл	0,3мл	0,15мл	–
0,1% DMSO (на мор. воде)	–	0,3мл	0,6мл	0,9мл	1,2мл	1,32мл	1,5мл

Табл. 1: Схема разведения растворов активаторов и ингибиторов сигнального пути Wnt.

Далее полученные растворы были аликвотированы в ячейки 12-тилуночного планшета из расчета 1.5мл раствора в каждую ячейку. Схема эксперимента представлена на Рис. 3.

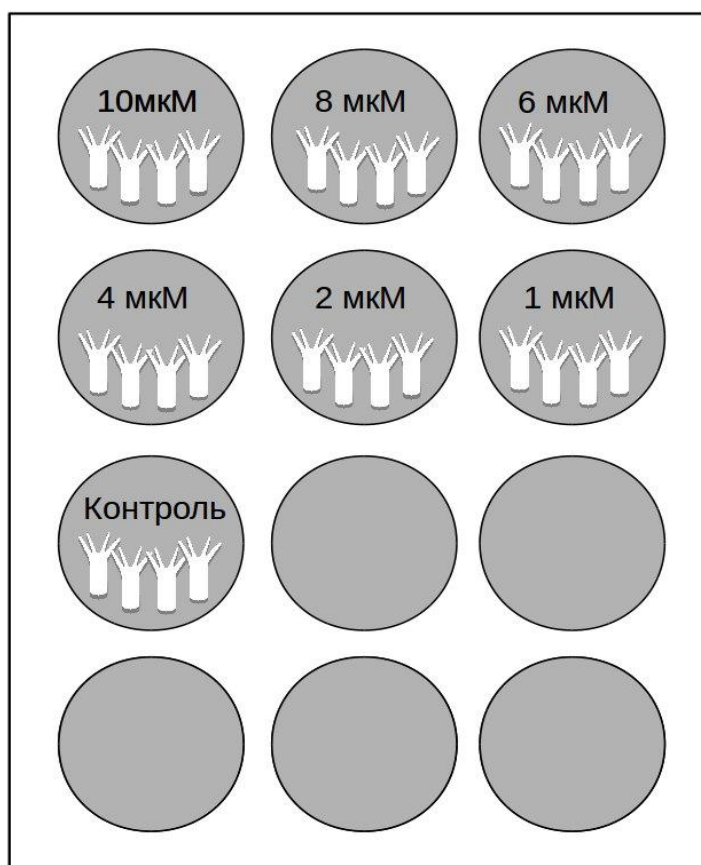


Рис. 3: Схема эксперимента.

В каждую ячейку с раствором помещали 4 сцифистомы. Растворы менялись каждые 24 часа. До начала стробилиции растворы готовились на морской воде с добавлением индуктора стробилиции 5-метокси-2-метил индола. После того, как животные в контрольном эксперименте начинали стробилировать, приготовление растворов осуществлялось на чистой морской воде.

Каждый день проводили наблюдения за состоянием подопытных животных и фиксировали информацию о стадии жизненного цикла, на которой находится каждая особь.

Вследствие малого количества реагентов, имевшихся в наличии, эксперимент с ингибитором IWP-3 проводился с использованием 1-ой повторности, с ингибитором iCRT14 – 2-ух повторностей, с активатором BIO – 1-ой повторности, с активатором allosteripaulone – 1-ой повторности.

На основе полученных данных был проведен статистический анализ методом χ^2 и были построены графики в программной среде R(R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>).

Исследования проведены с использованием оборудования ресурсных центров «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и «Культивирование микроорганизмов» Научного парка СПбГУ.

4. Результаты.

Поиск по базе данных Compaen в транскриптоме *A. aurita* позволил идентифицировать 6 генов Wnt семейства, относящихся к 6 подсемействам, соответственно - Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt4, Wnt5, Wnt6. Сравнение выбранных последовательностей с гомологичными последовательностями в базе данных NCBI с помощью алгоритма BLAST подтвердило принадлежность данных генов к Wnt семейству. Было установлено, что все 6 последовательностей имеют открытые рамки считывания (последовательности приведены в приложении 1). Полученные таким образом транслированные аминокислотные последовательности были использованы для анализа сходства с генами Wnt семейства у других представителей группы Cnidaria. Филогенетический анализ показал, что выбранные последовательности действительно относятся к интересующему нас семейству генов и хорошо кластеризуются по подсемействам с Wnt генами других кишечнополостных (Рис. 4).

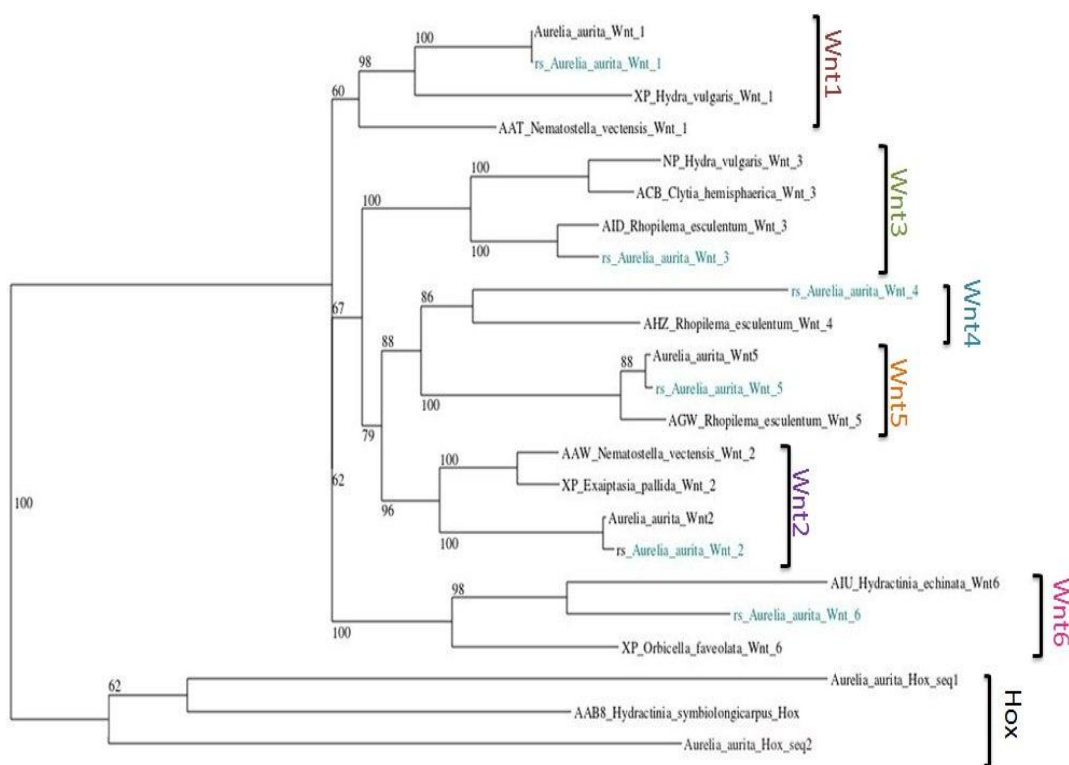


Рис. 4: Кладограмма, отражающая филогенетические отношения генов Wnt-семейства различных групп Cnidaria.

К идентифицированным последовательностям были подобраны специфичные праймеры. Последовательности праймеров приведены в приложении 2. Амплификация с полученными праймерами с использованием кДНК сцифистом, стробил и эфир позволила выделить фрагменты двух генов: AauWnt1 и AauWnt4 (Рис. 5).

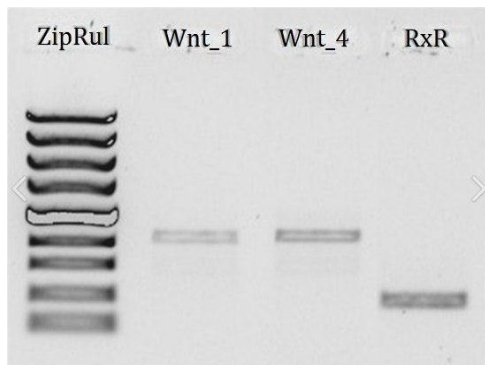


Рис. 5: Результат гель-электрофореза амплифицированных фрагментов генов Wnt1 и Wnt4. ZipRul-маркер, RxR-контроль

Полученные фрагменты были клонированы, и в результате мы получили плазмиды, содержащие интересные нас вставки. Интересующий нас фрагмент встроился в плазмиду в обратном направлении. Для синтеза зондов с использовалась SP6 полимеразой и T7 в качестве контроля (Рис. 6).

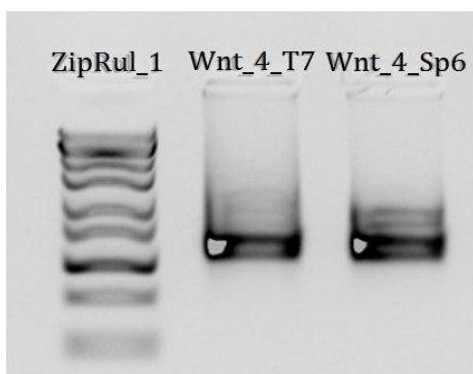


Рис. 6: Зонды к гену Wnt4.

Wnt_4_T7-зонд, синтезированный с T7 полимеразой, Wnt_4_Sp6-зонд, синтезированный с Sp6 полимеразой.

С помощью РНК гибридизации *in situ* удалось обнаружить зоны экспрессии гена Wnt4 у эфир и поздних стробил. У эфир зоны экспрессии наблюдаются в кончиках лопастей (вокруг ропалиев). У поздних стробил также отмечены зоны экспрессии в лопастях будущих эфир. На стадиях сцифистомы и ранней стробилы домены экспрессии исследуемых генов обнаружены не были (Рис. 7, Рис. 8).

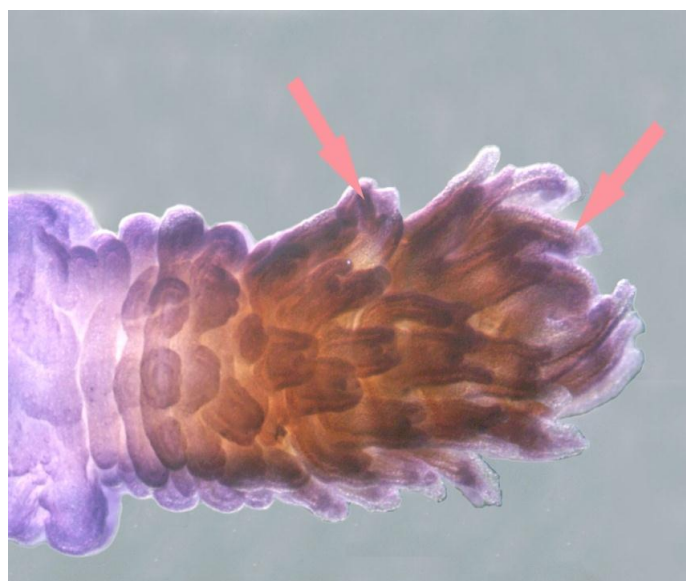


Рис.7: РНК гибридизация in situ, Wnt4. Поздняя стробила.

Стрелками указаны области экспрессии в районе лопастей будущих эфир.

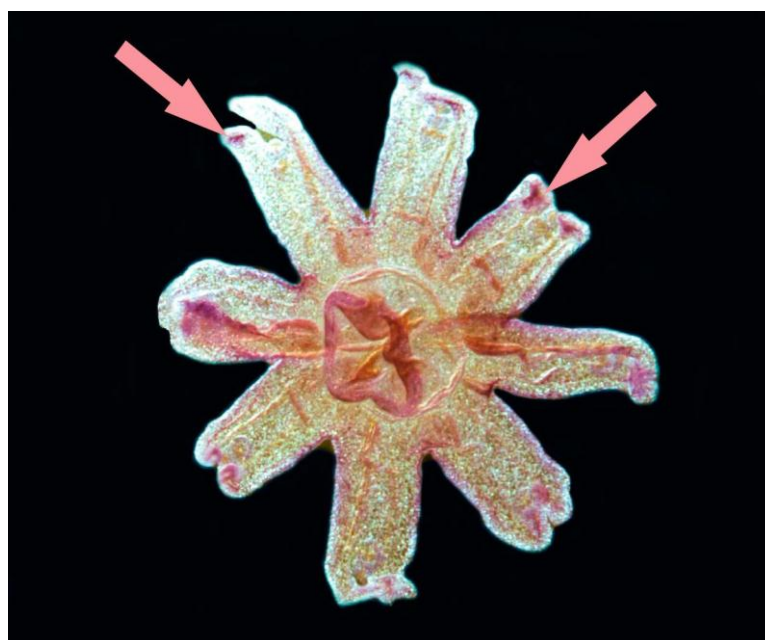


Рис. 8: РНК гибридизация in situ, Wnt4. Эфира.

Результаты экспериментов по воздействию ингибитора iCRT14 на процесс стробилиляции показали, что с повышением концентрации ингибитора время начала стробилиляции откладывается на более поздний срок. Животные, находящиеся в растворе с концентрацией iCRT14 равной 8 мкМ и 10 мкМ, не перешли к стробилиляции в течение всего времени проведения эксперимента (Рис. 9).

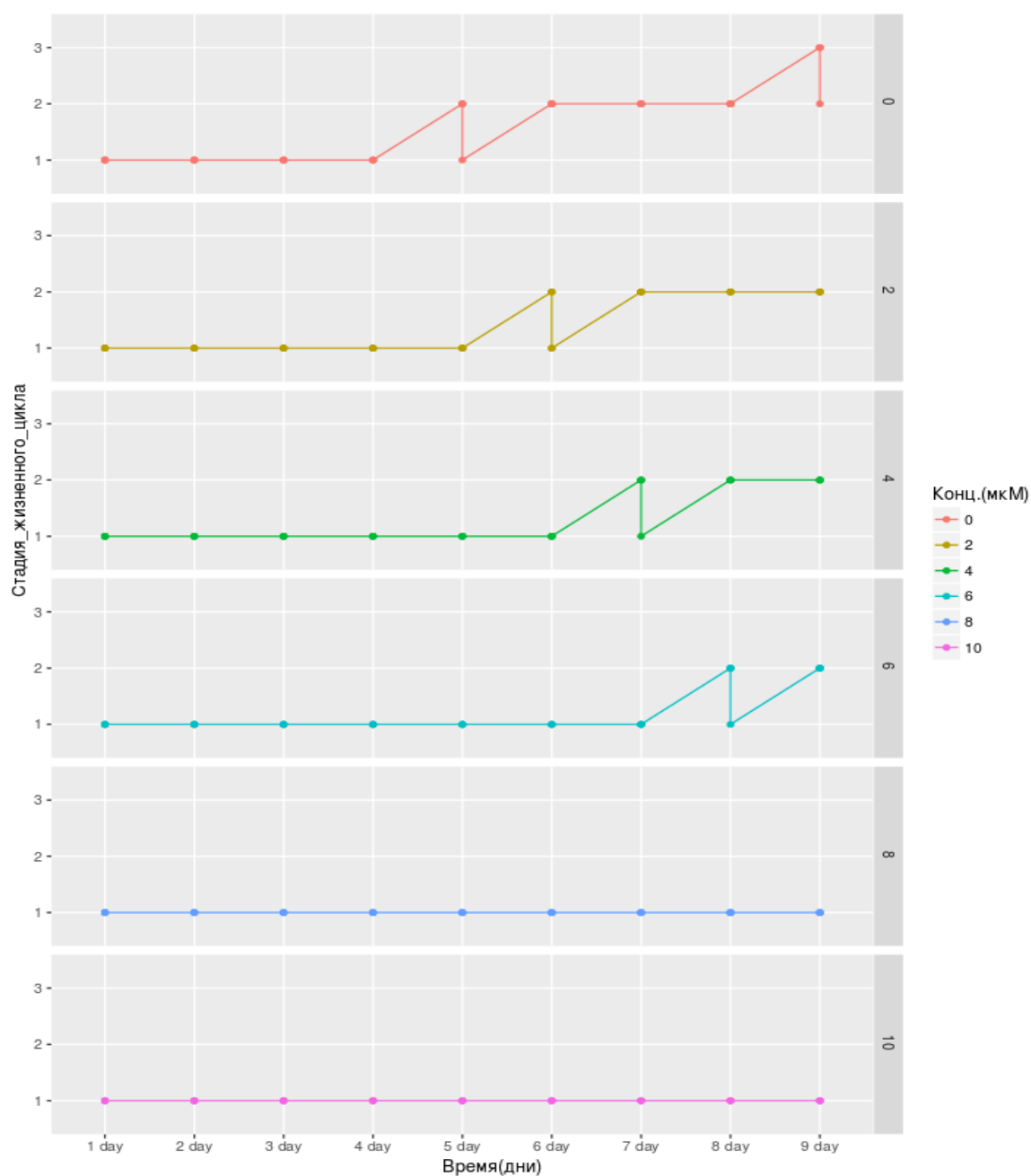


Рис. 9: График зависимости дня начала стробилиляции от концентрации ингибитора iCRT14.

Статистический анализ подтвердил влияние концентрации ингибитора на день начала стробилиции ($\chi^2 = 65.5$ on 6 degrees of freedom, $p = 3.41 \times 10^{-12}$). На основе этого анализа были построены кривые выживаемости Каплана-Мейера, отражающие кумулятивную вероятность наступления стробилиции в зависимости от срока с начала эксперимента для разных концентраций ингибитора iCRT14 (Рис. 10).

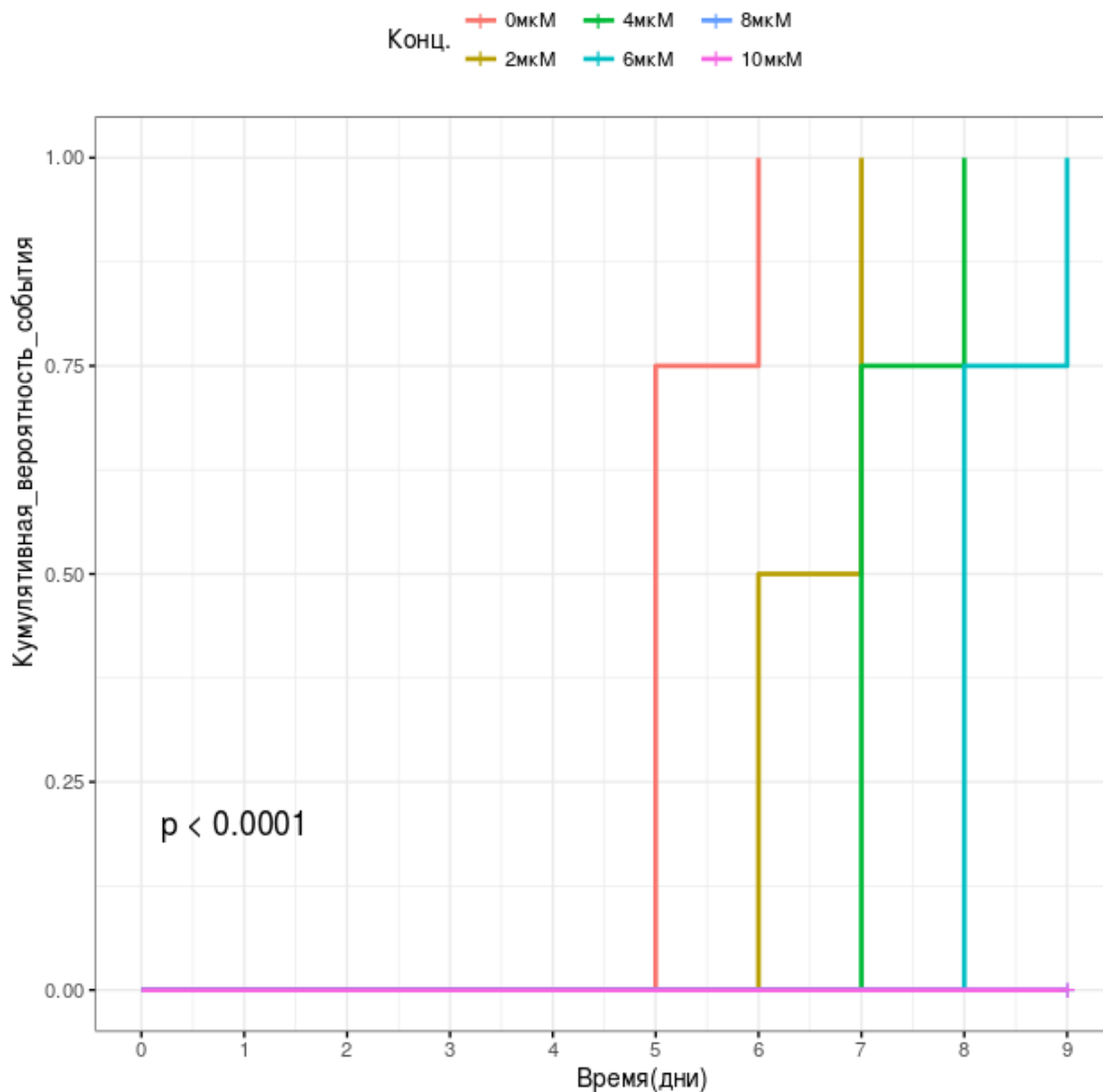


Рис. 10: Кумулятивная вероятность наступления стробилиции в зависимости от срока с начала эксперимента для разных концентраций.

В результате эксперимента с использованием ингибитора IWP-3 не было зарегистрировано его влияние на время наступления стробилиации. Однако, было показано, что животные, находящиеся в растворе с концентрацией ингибитора 10 мкМ отпочковывают эфир с аномальным количеством лопастей (Рис. 11). На других концентрациях данный эффект не был замечен.

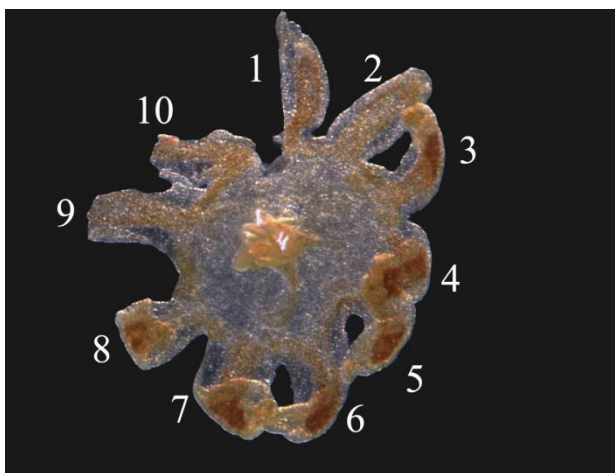


Рис. 11: Результат воздействия ингибитора IWP-3. Концентрация 10 мкМ.

Эфира с аномальным количеством лопастей.

Эксперимент с использованием активатора «azakenpaullone» не удалось завершить, так как его токсическое воздействие приводило к преждевременной смерти сцифистом.

В ходе экспериментальной работы с активатором ВЮ наблюдалось уменьшение сроков наступления стробилиации. Уже на 4-ый день было отмечено, что сцифистомы, помещенные в раствор с концентрацией активатора 2 мкМ, приступили к стробилиации, в то время как у животных в контрольной лунке была заметна лишь едва намечающаяся перетяжка. (Рис. 12) На 8-ой день в лунке с концентрацией активатора 2 мкМ уже наблюдались поздние стробилы, в контроле - ранние стробилы. (Рис. 13) На 10-ый день животные в растворе с концентрацией ВЮ 2 мкМ начали отпочковывать эфир, а в контрольной лунке были зафиксированы поздние стробилы (Рис. 14).

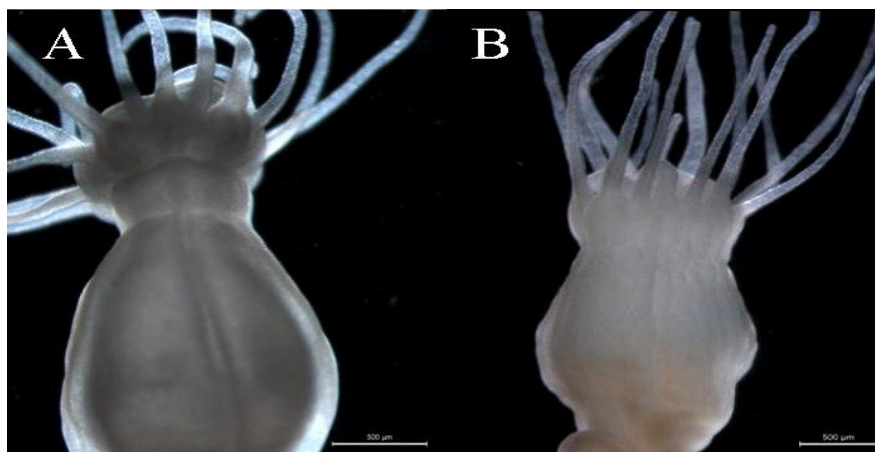


Рис. 12: Воздействие активатора ВЮ. Концентрация-2 мкМ. 4-ый день.

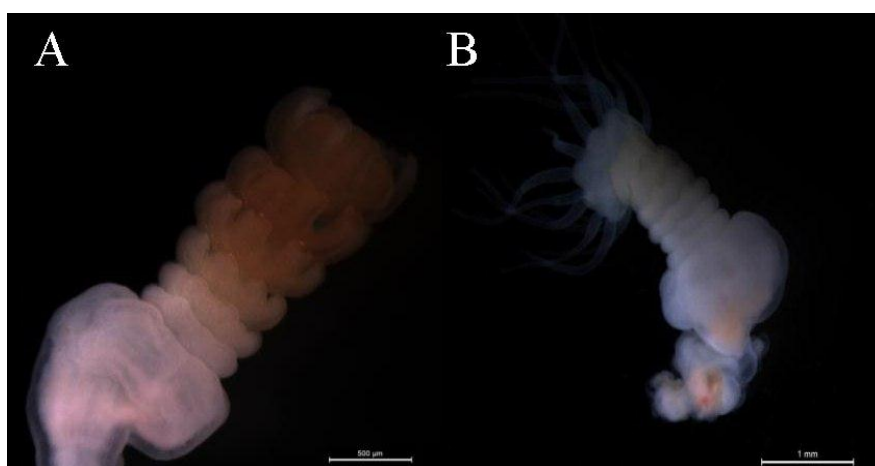


Рис. 13: Воздействие активатора ВЮ. Концентрация-2 мкМ. 8-ой день.

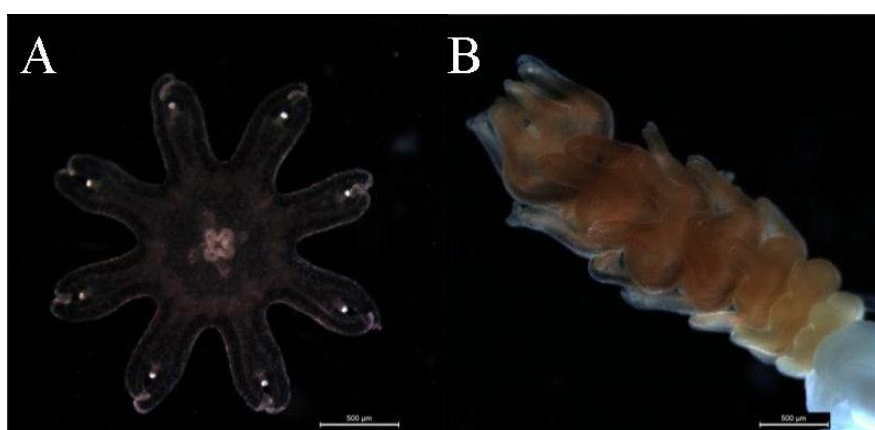


Рис. 14: Воздействие активатора ВЮ. Концентрация-2 мкМ. 10-ый день.

5. Обсуждение результатов.

Компоненты и функции сигнального пути Wnt довольно подробно изучены во многих группах многоклеточных животных (Croce and McClay 2008; Prud'homme et al. 2002; Hensel et al. 2014b; Petersen and Reddien 2009). Однако, одна из базальная группа Metazoa - Cnidaria, представляющая большой интерес в свете эволюционных тенденций Wnt-каскада, остаётся мало изученной (Hensel et al. 2014). Целью данной работы стало изучение сигнального пути Wnt у представителя класса Scyphozoa - *Aurelia aurita*.

В транскриптомной базе данных Comragen были найдены последовательности, предположительно являющиеся генами Wnt семейства *A. Aurita*. Подробный анализ данных последовательностей, сравнение их с гомологичными генами других представителей группы Cnidaria и последующий филогенетический анализ подтвердили это предположение. Таким образом, эти данные и данные, представленные в литературе, свидетельствуют о наличии канонического (β -катенин зависимого) сигнального пути Wnt у *A. aurita* (Brekman et al. 2015; Kusserow et al. 2005).

В ходе работы удалось амплифицировать 2 гена Wnt семейства - Wnt1 и Wnt4 с использованием специфичных праймеров. Это свидетельствует о том, что данные гены участвуют в регуляции процесса стробилиции (Fuchs et al. 2014). Остальные 4 гена – Wnt2, Wnt3, Wnt5 и Wnt6 не удалось амплифицировать. Это может быть связано с тем, что эти гены экспрессируются на других стадиях сложного жизненного цикла *A. aurita* (Brekman et al. 2015). Таким образом, участие этих генов в процессе стробилиции не было подтверждено.

Нами была проведена РНК-гибридизация *in situ* с генами Wnt1 и Wnt4. Зоны экспрессии гена Wnt1 не были обнаружены. Это может быть связано с низким уровнем экспрессии данного гена или с рядом технических проблем. Однако удалось зафиксировать сигнал гена Wnt4 на стадиях эфиры и поздней стробилы. На стадии эфиры экспрессия Wnt4 наблюдалась по краям лопастей вокруг ропалиев. Зоны экспрессии подобного плана еще не были описаны в литературе, однако эти данные согласуются с предположением о различии экспрессии Wnt генов в разных группах Cnidaria в соответствии с выполняемыми ими функциями (Hensel et al. 2014). Также был обнаружен слабый сигнал в области рта эфиры. Этот результат согласуется с литературными данными по другим группам Cnidaria, однако, в нашем случае, это скорее всего результат неспецифической реакции (Holstein 2009; Minobe et al. 2000; Guder et al. 2006; Lee et al. 2006). В поздней стробиле зоны экспрессии Wnt4 расположены аналогично - по краям лопастей еще

несформировавшихся эфир. Эти данные свидетельствуют о важной роли сигнального пути Wnt в формировании лопастей медузоидной стадии в процессе стробилиации сцифоидных медуз (Hensel et al. 2014b). Интерпретация экспрессии Wnt4 в области рта на данный момент не представляется возможной, так как требует проверки.

Эксперимент с использованием ингибитора канонического и неканонического сигнальных путей Wnt - IWP3 также подтвердил участие Wnt каскада в формировании лопастей (Tang 2009; García-Reyes et al. 2018). Сцифистомы, которые находились в растворе с концентрацией ингибитора 10мкМ, в ходе стробилиации отпочковывали эфир с аномальным количеством лопастей. Нами были зафиксированы эфиры с 5, 6 и 9 лопастями. Эфиры с нормальным количеством лопастей (8 лопастей) практически не наблюдались.

Исследование влияния ингибитора канонического сигнального пути Wnt - iCRT14 подтвердило важную роль данного сигнального пути в процессе стробилиации. Было установлено, что с повышением концентрации ингибитора процесс стробилиации откладывается на более поздний срок. Так, сцифистомы, находящиеся в контрольной лунке, в среднем приступали к стробилиации на 5-ый день. Животные, помещенные в раствор с концентрацией 2 мкМ- на 6-ой, 4 мкМ — на 7-ой, 6 мкМ — на 8-ой. В контрольной лунке на 8-ой день уже наблюдались поздние стробилы. Сцифистомы, помещенные в растворы с концентрацией ингибитора 8 мкМ и 10 мкМ, к стробилиации не приступали. Влияние концентрации ингибитора на день начала стробилиации было статистически подтверждено. Таким образом, можно сделать вывод, что чем больше концентрация ингибитора, тем позже начинает формироваться медузоидная стадия. На критических концентрациях ингибитора (8-10 мкМ) стробилиация полностью прекращается. Эти данные подтверждают важную роль сигнального пути Wnt в формирование медузоидного поколения *A.aurita*. Эксперименты с использованием ингибитора iCRT14 на *Hydra vulgaris* подтвердили важную роль сигнального пути Wnt в процессах регенерации и формировании первичной оси тела (Watanabe et al. 2014; Gufler et al. 2018).

Также было изучено влияние активатора канонического сигнального пути Wnt на процесс стробилиации. В качестве активатора был использован BIO, который как и «alsterpaullone» является ингибитором GSK-3 киназы (Trevino et al. 2011). Однако, эксперименты с использованием этого активатора на других группах кишечнополостных демонстрировали образование дополнительных осей тела и эктопических щупалец у

животных (Lee et al. 2006; Duffy and Plickert 2010; Teo et al. 2006). В ходе эксперимента с активатором BIO наблюдалось уменьшение сроков наступления стробиляции. Уже на 4-ый день сцифистомы, помещенные в раствор с концентрацией активатора 2 мкМ, приступили к стробиляции. На 8-ой день в этой лунке уже наблюдались поздние стробилы, а на 10-ый день животные начинали отпочковывать эфир. В контрольном эксперименте стробиляция начиналась на 5-ый день, а эфиры наблюдались лишь на 11-12 день. Таким образом, активатор BIO способствует более раннему началу формирования медузоидного поколения *A. aurita*.

Полученные данные свидетельствуют о ключевой роли сигнального пути Wnt в процессе стробиляции, а именно в формировании медузоидного поколения, что может свидетельствовать о модификации функций Wnt в этой линии (Hensel et al. 2014). Однако для подтверждения этих результатов требуются повторные эксперименты, а также изучение реализации сигнального пути Wnt у других представителей группы Cnidaria, имеющих метагенетический жизненный цикл.

6. Выводы.

1. В транскриптоме *A. aurita* было идентифицировано 6 Wnt генов, относящихся к 6 подсемействам, соответственно (Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt4, Wnt5, Wnt6).
2. Показана экспрессия генов Wnt1 и Wnt4 в ходе стробилиации.
3. Выявлены зоны экспрессии гена Wnt4 в лопастях эфир и поздних стробил.
4. В присутствии ингибитора IWP-3 в процессе стробилиации формируются эфиры с аномальным количеством лопастей. Эффект наблюдается при концентрации ингибитора 10 мкМ.
5. С повышением концентрации ингибитора iCRT14 процесс стробилиации откладывается на более поздний срок.
6. В присутствии активатора BIO наблюдается уменьшение сроков наступления стробилиации. Эффект наблюдается при концентрации активатора 2 мкМ.

7. Заключение.

Исходя из полученных результатов, можно сделать заключение о том, что сигнальный путь Wnt играет важную роль в процессе стробилиации. РНК-гибридизация *in situ* с геном Wnt4 и экспериментальная работа с использованием активаторов(BIO) и ингибиторов(IWP3, iCRT14) сигнального пути Wnt указывают на то, что данный сигнальный путь участвует в формировании медузоидного поколения *A.aurita*. Эти данные согласуются с литературными данными и свидетельствуют в пользу того, что основные компоненты и функции Wnt-каскада сохраняются у всех Metazoa, однако некоторые Wnt-лиганды эволюционируют независимо в разных линиях, приобретая новые функции.

8. Благодарности.

Автор выражает благодарность Старунову В.В., Хабибулиной В.Р., Согомонян К.С., Зайнуллиной Б.Р., Крапивину В.А., Бабкиной И.Ю., Кремневу Г.А. и Фирсовой А.А. за помощь в выполнении работы, а также коллегам с кафедры Эмбриологии СПбГУ и кафедры Зоологии беспозвоночных МГУ за предоставление материала для экспериментальной части работы.

9. Список литературы.

1. Agathon, Antoine, Christine Thisse, and Bernard Thisse. 2003. "The Molecular Nature of the Zebrafish Tail Organizer." *Nature* 424(6947):448–52.
2. Albert, Reka and Hans G. Othmer. 2003. "The Topology of the Regulatory Interactions Predics the Expression Pattern of the Segment Polarity Genes in *Drosophila Melanogaster*." 1–24.
3. Aman, Andy, Minhtu Nguyen, and Tatjana Piotrowski. 2011. "Wnt/ β -Catenin Dependent Cell Proliferation Underlies Segmented Lateral Line Morphogenesis." *Developmental Biology* 349(2):470–82.
4. Benedyk, M. J., J. R. Mullen, and S. DiNardo. 1994. "Odd-Paired: A Zinc Finger Pair-Rule Protein Required for the Timely Activation of Engrailed and Wingless in *Drosophila* Embryos." *Genes & Development* 8(1):105–17.
5. Bode, Hans R. 2003. "Head Regeneration InHydra." *Developmental Dynamics* 226(2):225–36.
6. Brekhman, Vera, Assaf Malik, Brian Haas, Noa Sher, and Tamar Lotan. 2015. "Transcriptome Profiling of the Dynamic Life Cycle of the Scypophozoan Jellyfish *Aurelia Aurita*." *BMC Genomics* 16(1).
7. Broun, M. 2005. "Formation of the Head Organizer in Hydra Involves the Canonical Wnt Pathway." *Development* 132(12):2907–16.
8. Broun, Mariya and Hans R. Bode. 2002. "Characterization of the Head Organizer in Hydra." *Development* 129(4).
9. Cho, Sung Jin, Yvonne Vallès, Vincent C. Giani, Elaine C. Seaver, and David A. Weisblat. 2010. "Evolutionary Dynamics of the Wnt Gene Family: A Lophotrochozoan Perspective." *Molecular Biology and Evolution* 27(7):1645–58.
10. Clevers, Hans. 2006. "Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease." *Cell* 127(3):469–80.

11. Cooper, H. S., S. Murthy, K. Kido, H. Yoshitake, and A. Flanigan. 2000. "Dysplasia and Cancer in the Dextran Sulfate Sodium Mouse Colitis Model. Relevance to Colitis-Associated Neoplasia in the Human: A Study of Histopathology, B-Catenin and P53 Expression and the Role of Inflammation." *Carcinogenesis* 21(4):757–68.
12. Croce, Jenifer C. et al. 2006. "A Genome-Wide Survey of the Evolutionarily Conserved Wnt Pathways in the Sea Urchin *Strongylocentrotus Purpuratus*." *Developmental Biology* 300(1):121–31.
13. Croce, Jenifer C. and David R. McClay. 2008. "Evolution of the Wnt Pathways." Pp. 3–18 in. Humana Press, Totowa, NJ.
14. Duffy, David J. and Gunter Plickert. 2010. "Wnt Signaling Promotes Oral but Suppresses Aboral Structures in *Hydractinia* Metamorphosis and Regeneration Sexual Development and Germ Cell Commitment View Project Metamorphosis View Project."
15. Erica et al. 2006. "The Genome of the Sea Urchin *Strongylocentrotus Purpuratus*." *Science (New York, N.Y.)* 314(5801):941–52.
16. Glasco, Derrick M. et al. 2012. "The Mouse Wnt/PCP Protein Vangl2 Is Necessary for Migration of Facial Branchiomotor Neurons, and Functions Independently of Dishevelled." *Developmental Biology* 369(2):211–22.
17. Graham, Thomas A., Carole Weaver, Feng Mao, David Kimelman, and Wenqing Xu. 2000. "Crystal Structure of a β -Catenin/Tcf Complex." *Cell* 103(6):885–96.
18. Green, Jennifer, Roel Nusse, and Renée van Amerongen. 2014. "The Role of Ryk and Ror Receptor Tyrosine Kinases in Wnt Signal Transduction." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(2).
19. Groden, Joanna et al. 1991. "Identification and Characterization of the Familial Adenomatous Polyposis Coli Gene." *Cell* 66(3):589–600.
20. Guder, C. et al. 2006. "The Wnt Code: Cnidarians Signal the Way." *Oncogene* 25:7450–60.
21. Hassel, Monika, Kerstin Albert, and Sonja Hofheinz. 1993. "Pattern Formation in *Hydra Vulgaris* Is Controlled by Lithium-Sensitive Processes." *Developmental Biology* 156(2):362–71.

22. Heikkilä, Minna, Helleli Peltoketo, and Seppo Vainio. 2001. "Wnts and the Female Reproductive System." *Journal of Experimental Zoology* 290(6):616–23.
23. Hensel, Katrin, Tamar Lotan, Steve M. Sanders, Paulyn Cartwright, and Uri Frank. 2014. "Lineage-Specific Evolution of Cnidarian Wnt Ligands." *Evolution and Development* 16(5):259–69.
24. Hobmayer, Bert et al. 2000. "WNT Signalling Molecules Act in Axis Formation in the Diploblastic Metazoan Hydra." *Nature* 407(6801):186–89.
25. Hogvall, Mattias. 2014. "Analysis of Wnt Ligands and Fz Receptors in Ecdysozoa: Investigating the Evolution of Segmentation."
26. Huelsken, Joerg and Juergen Behrens. 2002. "The Wnt Signalling Pathway." *Journal of Cell Science* 115(Pt 21):3977–78.
27. Hur, Jung and Sunjoo Jeong. 2013. "Multitasking β -Catenin: From Adhesion and Transcription to RNA Regulation." *Animal Cells and Systems* 17(5):299–305.
28. Isaeva, A. V et al. 2015. "[β -Catenin: Structure, Function and Role in Malignant Transformation of Epithelial Cells]." *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk* (4):475–83.
29. Kikuchi, Akira. 2000. "Regulation of β -Catenin Signaling in the Wnt Pathway." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 268(2):243–48.
30. Kikuchi, Akira, Shosei Kishida, and Hideki Yamamoto. 2006. "Regulation of Wnt Signaling by Protein-Protein Interaction and Post-Translational Modifications." *Experimental & Molecular Medicine* 38(1):1–10.
31. Kimelman, D. and W. Xu. 2006. " β -Catenin Destruction Complex: Insights and Questions from a Structural Perspective." *Oncogene* 25(57):7482–91.
32. Klein, Thomas J. and Marek Mlodzik. 2005. "PLANAR CELL POLARIZATION: An Emerging Model Points in the Right Direction." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21(1):155–76.
33. Kohn, Aimee D. and Randall T. Moon. 2005. "Wnt and Calcium Signaling: β -Catenin-Independent Pathways." *Cell Calcium* 38(3–4):439–46.

34. Kusserow, Arne et al. 2005. "Unexpected Complexity of the Wnt Gene Family in a Sea Anemone." *Nature* 433(7022):156–60.
35. Lee, Patricia N., Kevin Pang, David Q. Matus, and Mark Q. Martindale. 2006. "A WNT of Things to Come: Evolution of Wnt Signaling and Polarity in Cnidarians." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 17(2):157–67.
36. Lin, Rueyling, Russell J. Hill, and James R. Priess. 1998. "POP-1 and Anterior–Posterior Fate Decisions in *C. Elegans* Embryos." *Cell* 92(2):229–39.
37. Lin, Rueyling, Samantha Thompson, and James R. Priess. 1995. "Pop-1 Encodes an HMG Box Protein Required for the Specification of a Mesoderm Precursor in Early *C. Elegans* Embryos." *Cell* 83(4):599–609.
38. Liu, Chunming et al. 2002. "Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism." *Cell* 108(6):837–47.
39. Lo, Miao-Chia, Frédérique Gay, Raanan Odom, Yang Shi, and Rueyling Lin. 2004. "Phosphorylation by the β -Catenin/MAPK Complex Promotes 14-3-3-Mediated Nuclear Export of TCF/POP-1 in Signal-Responsive Cells in *C. Elegans*." *Cell* 117(1):95–106.
40. MacWilliams, Harry K. 1983. "Hydra Transplantation Phenomena and the Mechanism of Hydra Head Regeneration: II. Properties of the Head Activation." *Developmental Biology* 96(1):239–57.
41. Miller, David J. et al. 2007. "The Innate Immune Repertoire in Cnidaria - Ancestral Complexity and Stochastic Gene Loss." *Genome Biology* 8(4):R59.
42. Minobe, S., K. Fei, L. Yan, Michael P. Sarras Jr., and M. J. Werle. 2000. "Identification and Characterization of the Epithelial Polarity Receptor "Frizzled" in *Hydra Vulgaris*." *Development Genes and Evolution* 210(5):258–62.
43. Miyawaki, Kyoji et al. 2003. "Nuclear Localization of β -Catenin in Vegetal Pole Cells during Early Embryogenesis of the Starfish *Asterina Pectinifera*." 121–28.
44. Mosimann, Christian, George Hausmann, and Konrad Basler. 2009. " β -Catenin Hits Chromatin: Regulation of Wnt Target Gene Activation." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(4):276–86.

45. Müller, Werner A., Regina Teo, and Uri Frank. 2004. "Totipotent Migratory Stem Cells in a Hydroid." *Developmental Biology* 275(1):215–24.
46. Nusse, R., A. van Ooyen, D. Cox, Y. K. Fung, and H. Varmus. 1984. "Mode of Proviral Activation of a Putative Mammary Oncogene (Int-1) on Mouse Chromosome 15." *Nature* 307(5947):131–36.
47. Plickert, Günter, Vered Jacoby, Uri Frank, Werner A. Müller, and Ofer Mokady. 2006. "Wnt Signaling in Hydroid Development: Formation of the Primary Body Axis in Embryogenesis and Its Subsequent Patterning." *Developmental Biology* 298(2):368–78.
48. Prud'homme, Benjamin et al. 2003. "Arthropod-like Expression Patterns of Engrailed and Wingless in the Annelid *Platynereis Dumerilii* Suggest a Role in Segment Formation." *Current Biology* 13(21):1876–81.
49. Prud'homme, Benjamin, Nicolas Lartillot, Guillaume Balavoine, André Adoutte, and Michel Vervoort. 2002. "Phylogenetic Analysis of the Wnt Gene Family: Insights from Lophotrochozoan Members." *Current Biology* 12(16):1395–1400.
50. Satou, Yutaka, Kaoru S. Imai, and Nori Satoh. 2001. "Action of Morpholinos In *Ciona* Embryos." *Genesis* 30(3):103–6.
51. Schneider, V. A. and M. Mercola. 2001. "Wnt Antagonism Initiates Cardiogenesis in *Xenopus Laevis*." *Genes & Development* 15(3):304–15.
52. Sharma, R. P. and V. L. Chopra. 1976. "Effect of the Wingless (Wg1) Mutation on Wing and Haltere Development in *Drosophila Melanogaster*." *Developmental Biology* 48(2):461–65.
53. Struhl, Gary and Konrad Basler. 1993. "Organizing Activity of Wingless Protein in *Drosophila*." *Cell* 72(4):527–40.
54. Technau, U. et al. 2000. "Parameters of Self-Organization in Hydra Aggregates." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(22):12127–31.
55. Teo, Regina, Frank Möhrle, Günter Plickert, Werner A. Müller, and Uri Frank. 2006. "An Evolutionary Conserved Role of Wnt Signaling in Stem Cell Fate Decision." *Developmental Biology* 289(1):91–99.

56. Teragawa, Carolyn K. and Hans R. Bode. 1990. "Spatial and Temporal Patterns of Interstitial Cell Migration in *Hydra Vulgaris*." *Developmental Biology* 138(1):63–81.
57. Thorpe, Christopher J., Ann Schlesinger, J. Clayton Carter, and Bruce Bowerman. 1997. "Wnt Signaling Polarizes an Early *C. Elegans* Blastomere to Distinguish Endoderm from Mesoderm." *Cell* 90(4):695–705.
58. Trevino, Michael, Derek J. Stefanik, Richard Rodriguez, Shane Harmon, and Patrick M. Burton. 2011. "Induction of Canonical Wnt Signaling by Alsterpaullone Is Sufficient for Oral Tissue Fate during Regeneration and Embryogenesis in *Nematostella Vectensis*." *Developmental Dynamics* 240(12):2673–79.
59. Veeman, Michael T., Jeffrey D. Axelrod, and Randall T. Moon. 2003. "A Second Canon: Functions and Mechanisms of β -Catenin-Independent Wnt Signaling." *Developmental Cell* 5(3):367–77.
60. Wei, Z., J. Yaguchi, S. Yaguchi, R. C. Angerer, and L. M. Angerer. 2009. "The Sea Urchin Animal Pole Domain Is a Six3-Dependent Neurogenic Patterning Center." *Development* 136(7):1179–89.
61. Whangbo, J., J. Harris, and C. Kenyon. 2000. "Multiple Levels of Regulation Specify the Polarity of an Asymmetric Cell Division in *C. Elegans*." *Development (Cambridge, England)* 127(21):4587–98.
70. Wikramanayake, Athula H. et al. 2003. "An Ancient Role for Nuclear β -Catenin in the Evolution of Axial Polarity and Germ Layer Segregation." *Nature* 426(6965):446–50.
71. Wikramanayake, Athula H. et al. 2004. "Nuclear β -Catenin-Dependent Wnt8 Signaling in Vegetal Cells of the Early Sea Urchin Embryo Regulates Gastrulation and Differentiation of Endoderm and Mesodermal Cell Lineages." *Genesis* 39(3):194–205.
72. Wolpert, Lewis. 1971. "Chapter 6 Positional Information and Pattern Formation." *Current Topics in Developmental Biology* 6:183–224.
73. Xu, Wenqing and David Kimelman. 2007. "Mechanistic Insights from Structural Studies of Beta-Catenin and Its Binding Partners." *Journal of Cell Science* 120(Pt 19):3337–44.
74. Zhang, Haining, Ahna R. Skop, and John G. White. 2008. "Src and Wnt Signaling Regulate Dynactin Accumulation to the P2-EMS Cell Border in *C. Elegans* Embryos." *Journal of Cell Science* 121(Pt 2):155–61

Приложение 1.

Нуклеотидные и полипептидные последовательности генов, выявленных в транскриптомной базе данных *Aurelia aurita*, линия «Роскофф».

1. AauWnt1

Нуклеотидная последовательность:

TACACGAGTATCATTGAAAAATTCTTTTTCCCGCACCGTCATCTCAGGATC
ATGGTCGATTGTAGAAGTGTCAAGTGGATGGATGAACAAAAGAGAGATTG
ATGGTTCTTCAAATTGGCATAAGCTCATCTTTGAGTGGGCAAGAAGTGCG
AAATAGCCGCCATTTTTATTTCCAGACATCGATTCTTGAACAGTTGCCTCG
ATAACAATTGACGTGATCAATCAAGATTGCCGCGTGTTTTGTCAGAGTTA
CTCGGGTCGTCGCTCATTGAAATCCCTCGAAAAAATCTTATTGTACGTCAA
AGGCCCAATCGACTTGCTCCTCACAGATATAAGGCTAGAAGCTGGGAAGA
CGCACAAGTTAGTTTGAATGTGGTTGCCACTCATATTCTTTCAGACTTTGA
AGAGACTTTGAAGAAGAGAACATGTTTTTGATCAAAGCGTGGTTTCATAC
TCTTTTGGTTGGGAGCTTTGTCTCTTAACTCAAACATATTGGTGGACATT
GGGCACCTTATATGGCAATGTAAACATCAATCAGGTGAAGTTAGCCAATC
ACATACAGGCACTAACAATAAAACAACAAAAAATCTTATTGAGACGAGATCC
CTCGCTGATGCCTTCGCTTGCACGTGGTGCTAAAATAGCGATTATGCAGTG
TCAAAAACAATTCAGAAACAGAAGATGGAATTGCTCAGCTCATCATTCTG
AATCTGTTTTTGGAAAAATTATCAGAACAGCTTGCAGAGAAACTGCATTC
GCCTACGCAATCACAGCTGCTGGTGTATCGTATGCACTGACACGCGCATG
CTCAGACGGATCCTTAAAAGGATGTCAATGTGTTTCTACGAATAGACATA
AACTGACCACTGAAGGATGGGAATACGAAGGTTGCCATGATAACGTCGA
ATTTCGGATATCGAGTTGGTAAAAAGTTTGTGGATAGTCGAGAACGAGGCA
GAGATTTTAGAGCCACTGTGAATTTGCATAACAACGAAGCTGGTCGAATG
GCTGTTTCGTCTTAACAGAAATCCATTGTCGATGCAATGGCGTTTCAGG
ATCTTGCCAAGTCAAAGTTTGCAGCAGAAAATTGGCTATATTTGATCAAG
TTGGTGTGCTGCTTAAAGAGAAATACGACACTGCACCTAGAGTTCAGGTG
GCGCAAGTCAAAGGTGCAAGACGAGCAAGAGATCACAAAATCAAGCCAG
TGAAGCAATTTATAAAGGACATCACTTCTCGAGATCTTGTATACTACGAG
GATTCCCCCGATTTTTTGCAACTACGACCTATCTGCGAGTGCACTCGGAACA
CGTGGGAGACAGTGCAATAATCAATCACTTGGGATCGATGGTTGTGAGCT
GCTTTGCTGTGGTCGTGGCTGGAAGACGACAAAAGTCAGCCGACAAAAG
AATTGCAACTGTAGATTTACTTGGTGCTGTGAAGTGCAATGTCAGTCATGT
AAACAGTCTAATCACATCAGTATTTGCAATTAAGAGCCAATGATAAACTA
TCGTGAAATATTGCTCGAGAATATATTAATAATGGGAGTCGCTCTCAGTCT
AATAGGAAGCTGATTTACAAGTACATAAATGCATTTGGAATTATATAGTG
TAGATCAACTAAAGACGCAAGTTTTTCAGAAATGCTAGCAAAGTGCAATG
GTTAGCTGTCAGGTTAGGCAAGAACCCTGCATAAAAAAATGTGATATTCT
AATGGGATTCGCCCTCAGTCTACTAGGAAGCTGATTTGCAAGTGCTTAAA
TGCACTTGATGTTATGAAGTGTAGATCAAGTAAAGATACATCATATTTTTT
AGAATGTGATCTTCCTTCAAAAGATACTCCTTCAATTTTGAGACACACCCC
TAACGATGTCTGAATATAGTTTTTGAATAAACGATATTGAAGTTTAGTACA
GTTTGTGCACTATTTGAATATCAAGACCGAATTGAAGTGAATCATATTTTCG

ACGAGATGTTACTTGATGGCTTCATCTACCCGAACTCTGAATTTTTTAATG
CGATTTGATAAATTCCAGTGATTTGTTCATCTGAACAGATTTTAACCAAGCT
TGCCATCATCACATTAAAGCCAATCTAAAGTGCAGGTTTATTGCGGTATTA
GTATCTCAGTGTTCATCTTTGCACATTTAGACGCAAATCAAGCATTAAATAGA
TATTGAAGTTTTGCTTGTCACTTCACGATTATGACGCCATACTGACTAAGC
GAATTCTTTCTAAGCACCATTTTATTTGGGATATTTATGAATATTTATTGTA
CATAAACTTTTGTTCAGTAATTTATGGTTTTTAGACAATTTGCTCTGGCCAA
CAGTTTGTATTTCATAGCAATTGTGTCTGTGTATCTTGCTTTATGAGCATA
AATTTTGCGAGCACCAGTGTAGATTGTCCAGAAAAAAGATTTCTGCATT
CAGCAAATTTCTTTGCTTATAATCTTTGCCAAAGTGGGTGCTTGCAGAGAG
CCAAAATCTTCAAAATAGACGGTGTGTGTGAATGGCTATTATGTGGTTCTT
TGGATTGAATGCTTTAATAAGAAGTATATAGGTTATTTTGCTATATAATCC
AACCTCGAACTTTCTGATATCTTGATAATTCCAAAGATTTCTGCCTGTTAC
ATATCACAACCTTGTGTGACGTTGGGCGCTCACCAAATTTATAAATCGTAAG
TAAGAAGAGCGACAGACTTGTAAGATATCAAAGTTATCTACCCTGGCCTT
TTCGTTCTCCTTTGCGGGAGCCGGAAGTAGTAAAATTGATTTAAAAAAT
TGTTTTTCTCAGTTTAAGTGTTTTGTGCTCATATCCTACGCCAGAAACAAA
ATAGGACCATGGTAGTTGTTTAGATTGCGCCATCAACTTCCGATTAAACCT
AATACTGGGTGTCCGAAAAGAGCACTCCTGTTTTAAAAAATCATCAACA
ATTGATTATCAAACCTTTGTTAAATTTTCTTTTTTGATTGTTTTTCAATGAC
CCAAAAATATTCATAGATGAT

Полипептидная последовательность:

MFLIKAWFHTLLVGSFVSLTQTYWWTLGLTYGNVNINQVKLANHIQALTIKQ
QKLLRRDPSLMPSLARGAKIAIMQCQKQFRNRRWNCSAHHSESVFGKIIRTA
CRETAFAYAITAAGVSYALTRACSDGSLKGCQCVSTNRHKLTTGWEYEGC
HDNVEFGYRVGKKFVDSRERGRDFRATVNLHNNEAGRMAVRRLTEIHCRCN
GVSGSCQVKVCSRKLAIFDQVGVLLKEKYDTAPRVQVAQVKGRRRRARDHKI
KPVKQFIKDITSRDLVYYEDSPDFCNLDLSASALGTRGRQCNNQSLGIDGCEL
LCCGRGWKTTKVSQRKNCNCRFTWCCEVQCQSCQSNHISICN

2. AauWnt2

Нуклеотидная последовательность:

TTTCATTCTATTGTGTCAATTATGTTTTGAGCTGTTTGAAAACCGAGCAGAA
AGTCGTTTGTGATTCTCAGATATATAGGTTGTTATGTATTGCACACCCCAC
TGTGATCTCGCCGCGCTGTAGAACAGAGCGACTATACGCGTCACATCAGC
CTTTATTTTAGCTGTCAATTCCGATCTGTCAACACTAACAAGGGTTTAGAA
ATCGATCTGGGCATCGCTGCGCTGATTCATTGTTGAGAAATCTCATTGAT
TGTCGACTGCTTGAAGCAGTTTTTGCAAGACGTTGAAAATGAAGCACATG
ATCATTGTGGTATTTCTTATTTTGGTCAATTTCTCAACTGGGGCTGTAAGC
CATTGGTGGCTGTAAAGTTCACAAGTCTTTTCGGTTGGTTCGAAGATTGGG
TGTAATAACATTGCTGGTTTGGTCAAGAGTCAAAGAGTAATTTGCTCAAG
ATATCCGCGATTGATGCTAAAAGTCGGCGAAGGTGCTGCTAAAGCATTGA
ATGAATGTCAAAGACAATTCAAATTTGGAAGATGGAAGTGTCTGTCACT
GATGGTACTTCCCCGATTCTTGGAATAATGAGCAAAGCAAATCGAGA
ATCAGCCTTCTTTCATTTCGATTTCATCTGCTGGCGTGGTACATGAAGTAAC

TCGGTCTTGCAGTCGTGGAGAATTGAGAGATGAATGTTCTTGCGATCGAA
 ACATGCATGGAGTTTATGGAAATGGTTTCATGTGGGATCGATGTAATGAT
 AACATTGAATTTGGAATGAAATTTTCCCGTGCATTTCTTGATGCAAGAGA
 GGTCGTCAATGATGCAAGAGCACTCCTTAATAAACACAATAACGAGGCTG
 GACGTCGGGCCGTTCAAGTCAACATGCAGATGCCATGCAAATGCCACGGA
 ATGTCGGGTTCGTGCACAACCAAATATTGCCACCGTTCATTACCAGCAAT
 GGAGAGAGTTGGCGATTATCTTCGGAAAAAATATCGCAGCGCAGTTCTCG
 TCACATTGGATCAAGCAAGTAACAAATTGGTGAATTATGATAGTGTGGTT
 AATAAATATGAGCCACTTGATTTGGTTTATTTGGAACGATCTCCAAATTAT
 TGTATCGTAATTTGGCACAAGGGACTGTTGGTACTGCTGGAAGGGAATG
 CAATAAATCATCGTTGTCTGAGAATAGTTGTGATATTATATGTTGTGGACA
 TGGTTACAACACGAAAAAGGTGGAAGAAAAAGTGAAGTCCATTGCAAG
 TTTATCTGGTGTTCAGGGTGGAGTGCAAGAAATGCACACAAATTGTTGA
 AAGGCATTACTGCAAGTCACGTGATGAGGTTCAACTTAGGCCAGGAGCAT
 CATACCAGGTACCACGAGAGACCAAAGGAAGTCGAGGCGAAAGAACAG
 AAAAAATAAAAGAAGACAAAGAAAAAGATAGAAAGAAGAGGAGGAAGCC
 AAAAAACAAGAAAAGCTAGCCAAGACAGCTAAAGAATCAACCATCGATCT
 TTAGGAGAAATCGACAGGCACACAGCCATACTCCAAGACGAAAATCTGA
 TGTTCATGCGATATTCGATTCCAGAAGTCGCTTTCACAGTCGACTTCACA
 CTGTTTTGTTTCTGGCTATGAATCCAGGAGATAGACAAAATCGGCTAAGG
 TTTG

Полипептидная последовательность:

MKHMVIIIVFLILVNFSTGAVSHWWLLSSQVFSVGSKIGCNNIAGLVKSQRVIC
 SRYPRMLKVGEGAALKALNECQRQFKFGRWNC SVTDGTSPI LGKLMSKANR
 ESAFFHSISSAGVVHEVTRSCSRGELRDECSCDRNMHGVYGNFMWDRCND
 NIEFGMKFSRAFLDAREVVNDARALLNKHNEAGRRAVQVNMQMPCCKCHG
 MSGSCTTKYCHRSPLAMERVGDYLRKKYRS AVLVTLDQASNKL VNYDSVV
 NKYEPLDLVYLERSPNYCYRNLAQGTVG TAGREC NKSSLSEN SCDIICCGHG
 YNTKKVEEKVNCHCKFIWCCRVECKKCTQIVERHYCKSRDEVQLRPGASYP
 GTTRDQRKSRRKNRKNRQRKDRKKRRKPKTRKASQDS

3. AauWnt3

Нуклеотидная последовательность:

CTCCCTGCTATCAGCTGACCCCTGTTCTG TAGCCCATGAAATAGTTGGTTCTG
 CCTGTGCTTGATTCATTAAGACTCGATCTTTGTGAGGAATAGTCGCAGAAT
 CAGCTAAGCCTTACTGTCAATTGCTTACGGATTACAGATTTATTTGAACGGC
 TTGCTTGAAGTTGGTTTTGAAATAATTTGGCAATTAAACATAAGATT CAGG
 ACTCTGCTAATAGGCACGACGAATCAGAGGAGGTTTCGTTGTAGACAAAA
 GCAAATCCTCTTATTTCAATTGAAGAGGCTCGACAATTTGTCAAAAAGAAC
 ATAAATCCCGCTTTATCTCAATTTATGACCATTTTGTCCCAGATACACGAC
 AATTCAAGAGCAAGAGTTTTCACTGAGAGGAACAATTGCTGCTGAAGGAT
 AAGCTGCTCATACCAAGATCAGAGGCATCTTTTGGATTAGAGAAGCGCGC
 TTCACACCTCCGGTCCCAAGAGAGTCGCCCGTCGCCCGGAGAGGGTTCTT
 TTCACGTGGCCGCAAAGTTAAAAAGCGGGCAGTCGGAATCGTTTGCCAAT
 CAACGTCAAAGCAAGTCGCTAAAGGAGCTGAAACTGCGGAGAAGATAAAA
 TCAAAAAAATTCACAAAGATGGCTGCTATCGTCGCTATATTTTTATTACA

TTAATTCAACATGGATACGCTTACTGGTGGGCTCTTGGCACCGGCAGTCTG
AACGTTATAAAACCGGACAGCAGGAGGCTTGTTACGAGTGCGTCGGTTTG
CAATCGCTTGAGTACCATATCGGACAAACAGAAGAAATTGTGTTCCGAAT
ATCCGGATTTATTACCAAGTGTTGCATTGGGTGCAAGGATATCAATTGAT
GAATGCAAGCGTCAATTTAAAGACAATAGATGGAAGTGCCTATCAACAA
GAAAGCATCAGTATTTGGAAAAATACTTGATAAAGGGACACGAGAATCA
GCCTTCATCCATGCTATAACCGCGGCTGGTCTTGCATCTGCAGTCACAGAG
GCATGTGCACAAGGAAAGTCAACTCATTGCAATTGTGATAACACGTACAG
GCAATCACCACCAGGCATTGGATGGAAATGGGGTGGATGTAGTAGAGATT
TCAATTTTGGACTTCGTTTTTCGGAGAGGTTTCGTCGACTCGTCAGAAGATG
GTCGCAAAAGAACTGCAAGGAAAGATATGAACAAGCATAACAACAGAGC
TGGAAGAGAGGCAATACGAAGTCACCTCTACAGAAAGTGCAAGTGTCAT
GGGCTTTCCGGATCTTGTGAAATGAAGACATGTTGGATCAATTTGCCAAA
ATTCCGACAGCTTGGTGGATTCTTACGCGAAAAATACAACAGTGACACAG
AAATGAGAGTGATCAAGAGGACGAAGAATGGCAAAGAGAAATACAAGC
GATTGAGACCAAAGAATAAGAACTACGATAAACCAACAGCTCAAGATCT
CATATACTACGAAAAATCACCTACGTTTTGCTCACAAGACAGTCGATTGG
GATCACTTGGAACGAGAGGACGAGAATGTAATATTACATCATCAGGAGCT
GATGGGTGTGATCAAATGTGTTGCCGAAGAGGATATGACTTCAGGGCAGT
GCCCCGTTACCAAATCATGTAAGTCAAAATTCGTATGGTGCTGTAGTGTAC
AGTGCCAGAAATGTACTGAGATTAAAAAGGTATATACTTGTAGGTAGATC
ATGATTAGATAATGGTTTATCGTAGCGTATGCACGTAATATTGATGTTAGA
TATCACGAGCTCCAGCCATTAGGGGAGACATCCACCTTAGTAGCAGGGCC
TAAGGCATCCTTGTTAGAAAATAGTTAGATCCTGGTAATGCAAGGTCTCT
GGTATTTTCGTGTCCAACCTCATTTTTAGCCGCTCGAGAGCATAGGGCTCAA
ATCTTTGCAAACTTTACAAGTGAATGCGTGGAATGCTGTTGCCTAATTCT
TTCAACTGAATGGATCGAAGGAACTTTGGGTCGTTTGCAGTAATTCCAAG
AAGAGAATTTTTGATAGCATCATTATTTCCGAGTTACAGCATTCTTTAAT
TTCTGCTAGTTTTGAATTTGTGACGTCATCAAATTGCTAAGTCGTAAACCA
TAAAAGTGACAGACGTTTGCTTGCTAGTTGCTACCATATTGTAGATCTTTA
AAAACCGAGTATTTCTTATATTGGTCAATTTGACTTTCCTCAATCAGCTTA
CAATTTATAGTGCTTTTAATCTTTGTCAAAGTTTCCGCTTTCCTCCTCTCGCT
TATCTTTTCATAAAGCTTAAAAACGCTGAAGTTCCAAAAATAATGGTGAT
ATCAAAAATGCTCTTTATGGAATTATGGCAAACGAACTAAAGTTCCCGAG
GATCCATTCAGTTGAAAGAGTTTGGCGATACCATTTTACATATACAGTTTT
TAAGTTTTGCAAAGATCTGAGCCATATGCTCTGCTCGAGACTGTCCCATTC
TCGAATTCGTTGCCCCAATTCTAGTGCCCTTCAGTACCCTTCATAATATGC
TTTGAAGCATCCTGGTTTTAAATACGGTTTTACCCTCAAAATAGAGCTGGA
AACTTTACATGCCTGGTTTTCGCGACAGCCGCACTTTCGATAGCTAGAAGA
CTGCCCCCTATTCTCGAAGGTGGTCAGGGTTTTATTGATCTAGTCGTGCT
AGATGATAAATGATTACGACGCTTATTTATTATGCATTAAATTTTTACTGT
AGATGTGTATATATTCTTAGATTTTATATCTCGTATTTTCTAATTCTATGAG
CTGAAATACTGATTAAGTGAATGGAATAACCTGATTTTGGATCAAAGTAA
GGCATTGCTAACGGACTCAACCTCAAATTCAACACTTGCCACCAATTTTA
CTTCAGTTAGCTCCGTATGTGCTTTGCTTTACTTTGAAACCAAATTATTTTG

CCAAACATGATCGTGAATTTATTAGGTAAAGGAGTGTTGCCTCGATTTTTT
 GAGGAGGCAAGCAATGTGCAGGCTAGTATTAAGAAGTACCTTGAGTTAA
 AATGTGTTCTTTAGCAAAAAGTTGATACCCGAGGAAAACATCATGCATC
 TGTATTACATCTCGCGAAGAAAATTCATAACAATTGATTTTCGATTGATA
 TTTTAGCTTTTAAATGACAATCACATTGCTTGCTACAACGTTTCAGTTAGT
 TCTTTTAAATGTATGTTTTTAAGTATATCGGACAATATCGTATTTTGATTGA
 CAATTTTACCTGGTAGTAATGGCTTCATGGAATTTGTTGATGGCTATCGAG
 TAACAGAGCAATACTTTTTTTGAAGGTCAGGTTTGCAAACTCTAATTTTT
 TTCACTTGAAGAACGTTTTGCTGTGACCAGTAATGGTTCATTTAAGGTTT
 TTTCTTTTTTGATAATCAATGACACCGTACGAAGAGGTACTTGGTCTTTAT
 GAAATGAAAATAAAGCAGAAAAAAGCTAAATCTATATAAACTTGAGTCA
 TAATCAACTAACAACAACGTCAAAACCAAAACAGAATAAAACAAACACA
 ATTTTAACAAACAACACTGTGGAGGCGATGGGATAGCGTGTGCAACCTCAGC
 TACGCGAAGAACCCGACGAAGGACGAAGACACTGCAACAACCTTTTCAAG
 TAGTTCCAAAGACAAAGCTGTGGTTCAATAACTAATGTATCAACTAGTAT
 TTAGCTAGTAGATTTTTTAAAACTGATGCTGATACTGTGCAATTAATCG
 CCTGTAAATTTTCTTTTCGAAGATAGCCATCAATAGCCTGCGTACATACTT
 TGGTTACTGGGGAGGAAAAGAAAGGAAGAACTAGTTCTTTCTTTCTTTT
 CTCCTAGTAACCAAAATCTGCGCGCAGGCTAAGCCATCAACAATTCCCA
 CTGAGTTTAACCTATTCCAACATGGAAAGCCATTGCACAAATCAATGGTT
 CTGCAATGAATATGAACTTTCTGCAAGTTGACTAACTTATTCTTATCATAT
 GCAGACTTGGTATGATAACATTTTATATTTATAATGTAAATTTAACTGCA
 GATGCACTTTTAAGACTGCAAATGAGAGCAAATTATCA

Полипептидная последовательность:

MAAIVAIFLFTLIQHGYAYWWALGTGSLNVIKPDSSRLVTSASVCNRLSTISD
 KQKKLCSEYPDLLPSVALGARISIDECKRQFKDNRWNCPPINKKASVFGKILDK
 GTRESAFIHAITAAGLASAVTEACAQKGKSTHCNCDNTYRQSPPGIGWKWGGC
 SRDFNFGLRFSEFVDSSDGRKRTARKDMNKHNNRAGREAIRSHLYRKCKC
 HGLSGSCEMKTWINLPKFRQLGGFLREKYNSAHEMRVIKRTKNGKEYKR
 LRPKNKNYDKPTAQDLIYYEKSPTFCSQDSRLGSLGTRGRECNITSSGADGCD
 QMCCRRGYDFRAVPVTKSCNCKFVW

4. AauWnt4

Нуклеотидная последовательность:

AATGTATAGAACGAGTTACTTAGATCTAGTGAATGTTTCATTTGTAGAATC
 ATCACAGGAATTTGCATTAAATTTAGTTTGGAGTTTGAGAAAGTCTCTTGG
 AAACGTCGTATGCAGGAAGTCATTTCTTCTTAAAATTACCAGAACAACT
 GCAAGAGGAGGCTAGCTGAAGCATTTGAGAAGACACGATTTTGTCTGAC
 TTCATTCTACGAGTTTGAGACGAAGACGTGATATTATCGAATGCAGAAAT
 CTATTTGACAATATGCACAGGCACAACGCAACTGACCAAGGAATCTGGCC
 AAGGATATCGTATTCTCAAACAGCGTTGCAGTCATGAAAGTATAAACAGT
 CAAAGTTATTGTTGACAATTCAACAAGCAGTATAGGGAACAGAGAAACA
 GCCATGAATAAAAGGGAGTTTCGTTGAAGCATTCTTCATTGTTAATGTGTCC
 ATGTTATTGACACTATTGATGAATACATCAGCTGGACAGCAATGGATGTC
 ACTGGCTCTTTCAACTCGTTTAATATCTGTCTCCAAAAGGCTTGACTGTGA

TTACTTCAAAGAGCTAACAGCATTACAGAAAAGATTCTGCAAGGACAACG
TAGCATTAATGCCCAGTGTAATAAAAGGTTCAATGATTGCTTTACGAGAA
TGCCAATACCAGTTTAAGTGGAGAAGATGGAAGTCTCTACTGTAAACAA
GTTTAGAAAGAGGCAGCCTTCGCCCTTTGGACTGGCATTGAAATCAGGTA
CCAGAGAAGCAGCATTTGTGCATTCAATTTTCTCAGCTGGTATCTCAAATG
CCATTACCAAAGAATGCAGTAAAGGCAAGATCGATAAGTGTAAGTGTGAC
GTAAATTTGCGAGGATATTCAGGGGCTGGCTTTCAATGGAGTGGATGCAG
TGATAATGTTTATTATGGAGTGCAATTTTCAAGAGCTTTTGTAGATGGTTA
TGAACGAGAAAGATGGAGGAATTCATGGTCTTTTGACAGGGTGCTAATGA
ATTTACACAACAATGAAGCTGGTAGAAAGGCGATCGAAAACAATCTTGCA
ATGCGTTGCAGTTGCCATGGAGTATCAGGAACATGTACAACAAGGACTTG
TGCCAGGGTGATTTCCTTCCTTCCAAGAAATTGGAATAAACTCAAGGAAA
AATTTGATTGTGCTTCGAAAGTCAAGCTGCAGAAAGTTGGGTCAAGGATT
GCCCTTTTGCCCGAAGACAGAAGACTCAAACCATTGACTAATCAGGATCT
AGCATATCTCCAGGATTCCCCATCTTATTGCAATGCAAACAAGAAAGAAG
GCAGCCTGGGTACAACAGGGAGATACTGTAATAAAGACTCGAAAGGTAT
TGATGGGTGCTCTTTGCTGTGTTGCGATCGAGGCTTCCGCACTCATATGGA
GACTGTAAAAAGAGGTGTAGATGCAAGTTCAGATGGTGTGGCCAGGTAA
CATGCAAAACATGTAAGATTAGGAAAAGGGTCCATACTTGTCTGTAAATA
AATTGCTCGTTAAAGCCTGGTTTCAGTAGGAATGTATAGCCAAGCCATGT
AGCTACCAACAACGTTATTTCCGGTATATTAGTCTATGACGTGTGACAAGT
TTTATTGTTTCACTTTTTGGGTCACTCGTTACGTAATTTACCAAGCACTATT
TGCAAAAATTGCCGAAAATTTGTTTGGAGCAGAGTACTACATTCAGATGA
CAAGAACTTAAAAATTTGATGATGTTGCACGATCAAGTCTTTTTGACTGTT
TCAAAGAAATTGAGGGGAAAATATGTTTTGCTTATTACGGATTTTCATCAC
GGGTTGTAGGATAAACTTAGGCTTCATGAATTAAGTGAATTGGTATGAAA
TAGGGGATATGGGTACCTTGTCTCCTTCTTGTGTTTGTCTTTGTCTTTACC
TTCTGGGGCAGCAATTGGGCTCCTTTTCAGGTCTAACGCTAAGGGCATCCA
CTTAGGCCCCGCATTCGTTGTTTAAAATAACCGCC

Полипептидная последовательность:

MNKREFVEAFFIVNVSMMLTLLMNTSAGQQWMSLALSTRLLSVSKRLDCDYF
KELTALQKRFCNDNALMPVSVIKGSMIALRECQYQFKWRRWNCSTVNFKRK
RQPSPFGLALKSGTREAAFVHSIFSAGISNAITKECSKKGIDKCNCDVNLRGYS
GAGFQWSGCSNDNVHYGVQFSRAFDGYERERWRNSWSFDRVLMNLHNE
AGRKAIENNLAMRCSCHGVSGTCTTRTCARVIPSFQEIGIKLKEKFDCAASKVK
LQKVGSRIALLPEDRRLKPLTNQDLAYLQDPSYCNANKKEGSLGTTGRYCN
KDSKGIDGCSLLCCDRGFRTHMETVKKRCRCKFRW

5. AauWnt5

Нуклеотидная последовательность:

TTAACGCCACTGCCACTGGCATTAAATCGTTGGGATTAATTCTAATTGGCTG
TAGAGTTTATTCAAGTGTGTATCATTATTAGTACGAGTGAGTTTTCCAGAC
GTTAGCTGTGAACAGTGTGAAGGTCTGTCTGTGAAGGTGAAATCGTGTAT
CGGATGAATTTTACCAAGACAGACCTCGGTCATCCCCTGATGTCACAGTC
ATTCAACTTGCAAATAGCTTGAATAGTTTATCTTACTGGCAGGAAAGAGT

TTAATTGCTGAGCTGCGCGCTCCCCTGTGCAGATTTTTGTGCGGAACGAACC
 TGTGACAGTCGCGTTGTGTAGCACTGTCTTGTAGCGAGAGCTTGAGCCAT
 AGTGTAGAATTGCAATTGAATTACAAGAAGCAAGTTTCAGAGAGAATCGT
 TTAGTGATACGCAAAGAACAGCTGTGAAATTATATAGCTGATTTGTTACA
 CCTGAGCGTGTTTATAATTTTCATTTGATACCAGAATTTTTATAAAGACGCA
 GTGCTGTTCTGTTGCAGGCTCAGTCTGGAATGGGACGTGGTCATTGATAGT
 GAAAGTCTACGGTCATTGATAGTGAAGGTCTGAAGTAATCACTGCTACAC
 ACTGTTTGCTACGTTGGAAGATTGGAAGACATGATGGCCAATCTATTTTCGT
 GGTGTTTTTCTGGTTATTTTCATTTTGTGTGTCACAATCAACTGCTTTATAATTA
 AGCCATTATCAATATGTTTCATCACGAAGAGGACTTTCAAGTCGACAGCAA
 GTCCTTTTGTAACAAATACAGAAATCATATGGAATTCATTGTTGATGGAAG
 CAAAATGGCGTTGGATGAATGTCAAAATCAATTCAAAGATAGAAGATGG
 AATTGCACATTTCCACTGAATCATATGAGAGGCTTCACACCTTTTATGCCT
 TTAGGCCACAGAGAAGCAGCATTTCGTACATGCGATAAATTGCAGCAGGAAC
 TTTTCATGCAATCAGCAGAGCTTGCATGGAATCAAAAATAACATCTCACT
 GTCATTGCAGCCAAGAACGACGGCCTGATGGCCTCAAAAAGTCTTTCTTA
 TGGGCTGGCTGTGGCGACAATTTACCATATGGTTATAAATTTAGTAAGAC
 GTTCGTTGATGGGAAGGAAGAATTGAGTGCGGGGGCAGGCACGCAGGAT
 ATTTGCGAGATCTCAAGAGTACTGATGAATTTGCACAATAACGAAGCTGG
 GCGCCGGGCTCTGATGGACAACCTCTTTGTACAGTGCCGATGTCATGGTTT
 ATCGAAAGGTTGTTCAACGAAGACATGTTATCGACAATAAAGCCCTTCA
 AAGTTGTCGGGAAAGCATTGAAAGACCAATACTCAAGTGCAATCGAAACT
 GAAATTTACAGAAGAGAACAACGAAAAGTGAAGGTGATATGGAATTGA
 AATTACGCGAGAAGTACCCACAGTATCAGAAAGTGTCTAAAAAGGATTTA
 GTTTATTTGAAAAGCTCCCCAGACTATTGCACGAGAGCTGTGAGACTAGG
 CTCTCATGGCACCAAAGGGAGGCAATGCAACCGAACCTCTCAAGGACTCG
 ATGGTTGCCAGTTGCTATGCTGTGGCCGTGGTTATCATGTAAAAAGACAA
 CTGACGCGGGACTCTTGTGCATGTCAGTTTATTTGGTGTTGTCATCTAAAA
 TGTCAGACCTGTGAAGTAGAAAAAATGTACACTATTGCAAGTAACGTAG
 ATCTCAGAGAGGATTCTATAGGGATGTATTTATTGAAATATTGCAAGCGA
 TGTGATTTACAGCAACCGAAAGAGCAGTGCGCAAATGACAGTATTATGC
 AAGGGTGGACGCCGAAAGCCAAGGTGAAATCCTGAGAAGATACAATGTT
 TTCCCAATGGGGATGACTTTTAATTGTATGGGGTAGCTTAAAAGTTGTTGC
 ACGGGCTAGGATAGGGACACGTACCCACATGGGTGTAGGAGCAGGGGGG
 GGGGGGGGG

Полипептидная последовательность:

MALDECQNQFKDRRWNCTFPLNHMRGFTPFMPLGHREAAAFVHAIIAAGTFH
 AISRACMESKITSHCHCSQERRPDGLKKSFLWAGCGDNLPGYKFSKTFVDG
 KEELSAGAGTQDISQISRVLMLNHNNEAGRRLMDNSFVQCRCHGLSKGCST
 KTCYRQLKPFKVVGKALKDQYSSAIETEISQKRTTKSEGDMELKLREKYPQY
 QKVSKKDLVYLKSSPDYCTRAVRLGSHGTKGRQCNRTSQGLDGCQLLCCGR
 GYHVKRQLTRDSCACQFIW

6. AauWnt6

Нуклеотидная последовательность:

TTCTAATATAATTCCACAAAGCTTAGATGTCTCTTGTTTATTCTGTCTCGGC
GATTCGCTGTCCGTCTTCGATATAATACGCAACATTGCGGCTTGGTCGCAT
ACGCAAAGAAGCCGAGAGTATGCGCTGAATCTTTATAAGAATACAGCAA
CTGATTTGGATGTTTGCGAAACACACACCTAGTAGAGGTCGTTTCGTCAATT
GTTCAACACTGCTAAGTAAGGATGTACTGCTGTGAGACCAAATACAAGGA
AGCACTGAGTCTTAAAATGCATCTTTGAAAGATAATTAATCAGTTTTTGT
GTTGGAATACTCAGGTCATGGACTTACATTGATTTTCAAGTTAAAAAGGA
TTTACGTCTCTTTGCGCTCTTCATAATAAAGCGAGTATTACCCAACCTCTGT
TGCCTGATTGCCTAACGCTGCAAGTGAACACCAGATATGCATACGTACTG
TGGAAGGCGATTTGTGTCATGGCTTTGCATTGTAATGCTAGTCCAAATAGC
TTGCGGCATATTAAAAACAAGGAATCCATTCCGACGACCAAACCATTTGT
CAGTGTGTATGAAATTCCCTTCATATCTCCGAAAGAACACACAGTTATGT
GCAAGTGTGAAAGACACAATGTTAGGCCTGGTCCTGCTAAATGGGACAAA
AAGAGCAACATTGGAATGCCAGAAGCAATTCAGCTCTAGAGTATGGAATT
GTTACATGACACGAAAGCCATAGAAGCTATTGTCAGCTTTGGCTACAGA
GAGACAGCTTACCTTTACGCCATACAATCTGCTGGTGTGTCACATGCAATT
ACGACAGGTTGCCACATGGGATTATTCGCAAATTGTCGCTGCATTTCCAA
GAAGAAGCGAAGACAAAGGAAGTTGGCTAAACACGAAAAGAGACAATTA
CATTACAATGGAAATATATTTGATTGGTCAGATCATTGTTTAGATCGAGCA
ATCAGCTTCGGGAAAGGAATGTCGAGAAAAGTGATGAGTAATGACAGAG
TGAGAGATGTCAGAGCTATTGTTGATAGGCACAACAAAGAAGCAGGAAG
ATTGGCACTGACATCCATGGAACCTGGACATCAAACCTCAATGCAAATGTC
ATGGGATATCAGGAGCTTGTACCTCAAACATGCGTACGTAAACTTCCA
GATTTTCAGAGATATTGGCAGCTTCCTGCTTCAAAGTATGACTCTGCAGTG
AAGGTAATGGCAGATAACAAAGGCAAGAAATTATTACCTAAAAAGCAAA
CTTTCAAACATCACACATCAACTGACCTGGTCTACACAGATGACTCGCCG
GATTTCTGCGTTGCAAATCCAAGCGCCGGATCCCTCGGTACTTCCGGGAG
GCGATGCGTGCCAGGCGAAGACAAACTGAACAGCTGCTCAATTTTATGTT
GCGACAAAGGCGAACAGAAAAACTACGTCATTTTGAAAGAACATTGTAA
CTGTCGCTTTCAATATTGTTGTGATGTGCGATGTGAGGTTTGTAGTAAAAA
TATAACTTCGTTCACTTGCAAATAAACGAAAATAGCAACAACGCCAAGAT
TACTTAGTGCAAAAGGGCAAAGAAAGGCTATTTGTACATGGTACAACAAT
AGATAGCAAACCTATATGAGCGTACGAGCCAGGAGGGATGGTAAGGCGGC
CCCCTCAACATTGGAAAATTTTGAAATTTAAGCCTCCTTCGGGCAAAAAT
CCGCCCTTATTAGAGCAAAATATTGATAAACAGTGGACCTTTTATCGAAC
AGACCCCTAGACTGTACCTACCTGTACGCTTGTAGCCAACCAGATTCACA
TCAAAGGCTAGTGTGGATGGCTAGCAATGCCAGAGAGGCTCTCTGATTAA
GAAAGCTTCTTGATGTAATGTGCCTGTGAAGCTTTTCATTGGATGTAGGGC
TATATCAAGTTATTAAACTGATTAAACTGAGTGATCACGACCAGTTTAGA
TTCAGGTAGGCTTCGTACCAGCATGTACCACCCTAGGTAAAGAGTGCGAA
GAGAAAAATAACATCAGAGTAGTACCGTACCACAGTCATATACCGGTTGA
GTAAAAAAAGTTAACACCTCGAATAAAAAAGTACGCTGCCGGTATTCAAAA
CTGAAATGCCAATCTTACATGTAAACATTTTCGTTAGGTGAAATCCTCCATC
ATGTTAACACAGAAATCAGGAAAATGCTGTTAGGGGTTTGTGTGGGAGCG

AGAATTCCATGTTTGATTCAGGTCCACGATTTACTTGCCATTGACGTTTAA
GTTATTTCTGACATTGATGACTGTATTGAATTTAGATTTCAATGG

Полипептидная последовательность:

MLGLVLLNGTKRATLECQKQFSSRVWNCSHDTKAIEAIVSFGYRETAYLYAI
QSAGVAHAITTGCHMGLFANCRCISKKKRRQRKLAKHEKRQLHYNGNIFDW
SDHCLDRAISFGKGMSRKVMSNDRVRDVRAIVDRHNKEAGRLALTSMELGH
QTQCKCHGISGACHLKTCVRKLPDFRDIGSFLLQKYDSAVKVMADNKGKKL
LPKKQTFKHHTSTDLVYTDDSPDFCVANPSAGSLGTSGRRCVPGEDKLNSCSI
LCCDKGEQKNYVILKEHCNCRFQYCCDVRCEVCSKNITSFTCK

Приложение 2.

Последовательности праймеров.

1. AauWnt1

Прямой: ATG TTT TTG ATC AAA GCG TG

Обратный: TGG CTC TTA ATT GCA AAT ACT

2. AauWnt2

Прямой: TGA AAA TGA AGC ACA TGA TCA

Обратный: GGT TGA TTC TTT AGC TGT CT

3. AauWnt3

Прямой: AAA GAT GGC TGC TAT CGT

Обратный: TCA TGA TCT ACC TAC AAG TAT

4. AauWnt4

Прямой: TCG CTA AAA TGC ATC ATA TAT TT

Обратный: GAG GTG ACT TCA TCG GC

5. AauWnt5

Прямой: ATG ATG GCC AAT CTA TTT CGT GG

Обратный: ATC TAC GTT ACT TGC AAT AGT GTA C

6. AauWnt6

Прямой: GAT ATG CAT ACG TAC TGT GG

Обратный: TCG TTT ATT TGC AAG TGA AC

Приложение 3.

Протокол РНК *in situ* гибридизации, оптимизированный для *Aurelia aurita*.

Подготовка образцов:

1. Расслабить животных в течение 5-10 минут в 7% растворе $MgCl_2$ на дистиллированной воде.
2. Зафиксировать в свежеприготовленном охлажденном растворе ПФА 4% на морской воде в течение 12ч при 4о. В случае продолжительного хранения поменять ПФА на метанол и хранить при -80о.

1 день.

Перекладываем из метанола в EtOH в чашки Петри.

1. Промыть EtOH в течение 10 минут ○
2. Дегидратировать в этаноле пошагово (в пробирках):
 - 75% EtOH/ 25% H_2O в теч. 10 мин. ○
 - 50% EtOH/ 50% H_2O в теч. 10 мин. ○
 - 25% EtOH/ 75% H_2O в теч. 10 мин. ○
3. Отмыть в фосфатном буфере 1х PBT (PBS+0,1% Tween-20) 10 минут, перенести на сетки. ○
4. Отмыть раствором 30% перекиси (H_2O_2) с 1х PBT в течение 10 минут. ○
5. Отмыть в PBT 3 раза по 10 минут. ○ ○ ○
6. Поместить в раствор протеиназы К с 1х PBT на 10 мин. ○
7. Промыть в рабочем растворе глицина. ○
8. Поменять раствор глицина, отмывать 10 минут. ○
9. Отмыть в 1х PBT три раза по 10 минут. ○ ○ ○
10. Отмыть в триэтанолаmine (pH = 7,8) 2 раза по 10 минут ○ ○
100 мМоль в MiliQWater, pH = 7,8 (мерить полосками, в районе 8)
11. Поменять триэтаноламин и добавить 2,5 мкл/мл уксусного ангидрида, выдерживать 5 минут. ○
12. Добавить 2,5 мкл/мл уксусного ангидрида туда же, выдерживать 5 минут. ○
13. Отмыть в 1х PBT 3 раза по 10 минут. ○ ○ ○
14. Перефиксировать в ПФА 4% (делать на PBS) в течение ночи. ○

2 день.

1. Отмыть в 1х PBT 3 раза по 10 минут. ○ ○ ○
2. Отмыть в 2х SSC (pH=7) два раза по 10 минут. ○ ○
3. Прогреть животных в 2х SSC при 70° на водяной бане в течение 20 минут. ○
4. Отмыть в растворе 50% 2х SSC\50% Hybridization solution (HS) в течение 10 минут в пробирках. ○
5. Отмыть в HS в течение 10 минут. ○
6. Пре-гибридизация в растворе HS+tRNA = 40мкг/мл при 55-60° в течение 2 часов. Не очень быстро помешивать на термошейкере. ○
7. Поменять HS+tRNA из расчета 1 мл на 1,5 мл пробирку. ○
8. Добавить 2 мкл зонда разведенного 1:50 к 50 мкл HSII (50% Формамид, 25% 20х SSC, 25% H₂O) ○
9. Денатурировать зонд 3-5 минут при 70 градусах. ○
10. Добавить весь зонд в пробирки с животными (финальная концентрация в пробирке – 1:25000)
11. Гибридизовать на ночь при 57° и постоянном перемешивании. ○

Отобрать зафиксированных зверей на тех же стадиях

1. Отмыть в 1х PBT 3 раза по 10 минут. ○ ○ ○
2. Отмыть в MAB-T (MAB+0,1% Tween-20) 3 раза по 10 минут. ○ ○ ○
3. Растолочь зверей в 1мл MAB-B (MAB-T+1% BSA- бычий альбумин) (можно хранить при -20) ○
4. Добавить Anti-DIG AP антител (на 6 проб = 6 мл Blocking solution). (На 3 мл раствора = 1,5 мкл антител). ○
5. Инкубировать в течение 12 часов при 4° при постоянном перемешивании. ○
6. На следующий день - центрифугировать при 14000 g 10 минут. ○
7. Использовать супернатант в нужном шаге на третий день.

3 день.

1. Отмыть пробы предварительно нагретыми на водяной бане растворами при температуре гибридизации - 57о. ○

* 100% HS - 10 минут ○

* 75% HS/25% 2х SSC - 10 минут ○

* 50% HS/50% 2х SSC - 10 минут ○

* 25% HS/75% 2х SSC - 10 минут ○

2. Инкубировать в 2х SSC+0,1 % CHAPS (погреть при 57о) 2 раза по 30 минут.

○ ○

Далее все растворы должны быть комнатной температуры.

3. Отмыть в МАВ-Т (МАВ+0,1% Tween-20) 2 раза по 10 минут. Из термостата вытащить. ○ ○

4. Отмыть в МАВ-В (МАВ+1% BSA) в течение часа. ○

5. Инкубировать в Blocking solution (80% МАВ-В/20% овечьей сыворотки) 2 часа при 4о и перемешивании.

6. Добавить антитела из расчета финальной концентрации — 1:2000 в тот же самый раствор и инкубировать 12ч при 4о постоянно перемешивая.

4 день.

1. Отмыть в МАВ-Т 9 раз по 20 минут ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○

2. Залить краской ВМ - purple ~ 400 мкл на пробу.

4. Ждать проявления зон экспрессии.

5. Залить водой, чтобы остановить реакцию. Воду лучше сменить несколько раз.

6. Материал можно хранить в 70% этаноле в течение двух недель.

Растворы:

- PBT - PBS+0,1% Tween-20
- 1х раствор глицина - 4 мг/мл в PBT
- HS - 50% Формамид, 5х SSC, 0,1 % Tween-20, 0,1 % CHAPS, 1х раствора Denhardt's K30, 100 мкг/мл гепарина в воде
- HSII - 50% Формамид, 25% 20х SSC, 25% H₂O
- MAB - 100 мМоль малеиновой кислоты, 150 мМоль NaCl, pH 7,5
- MAB-T - MAB+0,1% Tween-20
- MAB-B - MAB-T+1% BSA
- * NTMT - 100 мМоль NaCl (0,29 г), 100 мМоль Tris-HCl (5 мл), 50 мМоль MgCl₂ (0,5г) в воде - pH = 9.5 + 0,1% Tween-20 - на 50 мл раствора - пользуемся другой краской
- Триэтаноламин - 100 мМоль в воде pH = 7,8
- Протеиназа К - 1 мкл/20 мл PBT
- 20х SSC - 3 М NaCl, 0,3 цитрат натрия, pH = 7,0

